



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

FLORE

Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

VALUTAZIONE DIAGNOSTICA DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

Original Citation:

VALUTAZIONE DIAGNOSTICA DEL SISTEMA IMMUNITARIO / F. ALMERIGOGNA. - STAMPA. - (2005), pp. 1292-1314.

Availability:

This version is available at: 2158/229384 since:

Publisher:

PICCIN

Terms of use:

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

Publisher copyright claim:

(Article begins on next page)

TRATTATO DI MEDICINA INTERNA

Fondato da Paolo Larizza

Volume I – Tomo II

MALATTIE DEL SANGUE E DEGLI ORGANI EMOPOIETICI, DELLA MILZA E DELLA COAGULAZIONE

A cura di

GIUSEPPE G. NENCI

Professore Ordinario di Medicina Interna
Direttore, Medicina Interna e Cardiovascolare
Università degli Studi di Perugia
Direttore, Dipartimento Medicina Interna
Azienda Ospedaliera - Perugia

ANTONIA NOTARIO

Professore Ordinario di Terapia Medica
Direttore della Scuola di Specializzazione
in Medicina Interna
Università degli Studi di Pavia

IMMUNOLOGIA CLINICA

A cura di

GIANFRANCO DEL PRETE

Professore Ordinario di Medicina Interna
Dipartimento di Medicina Interna
Università degli Studi di Firenze

PICCIN

Tutti i diritti sono riservati

È VIETATA PER LEGGE LA RIPRODUZIONE IN FOTOCOPIA
E IN QUALSIASI ALTRA FORMA

È vietato riprodurre, archiviare in un sistema di riproduzione
o trasmettere sotto qualsiasi forma o con qualsiasi mezzo elettronico,
meccanico, per fotocopia, registrazione o altro,
qualsiasi parte di questa pubblicazione senza autorizzazione scritta dell'Editore.
Ogni violazione sarà perseguita secondo le leggi civili e penali.

AVVERTENZA

Poiché le scienze mediche sono in continua evoluzione, l'Editore non si assume alcuna responsabilità
per qualsiasi lesione e/o danno dovesse venire arrecato a persone o beni per negligenza
o altro, oppure uso od operazioni di qualsiasi metodo, prodotto, istruzione o idea contenuti in questo libro.
L'Editore raccomanda soprattutto la verifica autonoma della diagnosi e del dosaggio dei medicinali, attenendosi
alle istruzioni per l'uso e controindicazioni contenute nei foglietti illustrativi.

ISBN 88-299-1721-4

Stampato in Italia

© 2005, by Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova

VALUTAZIONE DIAGNOSTICA DEL SISTEMA IMMUNITARIO

(F. ALMERIGOGNA)

La necessità di eseguire una valutazione funzionale del sistema immunitario non rappresenta più soltanto un problema specialistico dell'immunologo clinico impegnato nella diagnostica e nello studio di patologie relativamente rare, come le immunodeficienze primitive. Con i progressi delle conoscenze sulla funzione del sistema immunitario e sul suo ruolo in numerose patologie e, soprattutto, con la sempre maggiore diffusione delle immunodeficienze secondarie (basti pensare all'infezione da HIV o alle forme iatrogene correlate all'impiego crescente di farmaci immuno-soppressori), la conoscenza dei test utilizzabili per la valutazione del sistema immunitario è entrata nel bagaglio culturale necessario a qualsiasi medico internista.

Pur senza entrare nei dettagli metodologici, questo capitolo si propone di illustrare le principali indagini attualmente disponibili per la valutazione del sistema immunitario, anche in relazione alla loro applicazione appropriata nelle diverse situazioni cliniche; ciò risulta importante nel periodo attuale in cui il contenimento della spesa sanitaria deve essere attentamente considerato dal medico al momento della programmazione degli esami laboratoristici. Anche per tale motivo le indagini sono presentate, e dovrebbero essere utilizzate, secondo un criterio di gradualità, per giungere alla effettuazione di esami più sofisticati e costosi soltanto quando siano effettivamente necessari ed insostituibili. Si deve tuttavia ricordare che una diagnosi più precoce possibile dei quadri di immunodeficienza, e la rapida messa in atto, ove disponibile, della terapia appropriata, possono salvare il paziente o risparmiargli conseguenze invalidanti derivate dalle infezioni, eventi cioè che comportano anch'essi costi sociali molto rilevanti.

INDICAZIONI ALL'EFFETTUAZIONE DEI TEST DI VALUTAZIONE DEL SISTEMA IMMUNE

L'indicazione ad effettuare indagini per la valutazione della funzionalità del sistema immunitario emerge dall'anamnesi e dall'esame obiettivo del paziente (Tabella XXXIV).

Nell'anamnesi familiare possono riscontrarsi elementi di sospetto o certezza per la presenza di immunodeficienze primitive a trasmissione ereditaria e dall'anamnesi fisiologica o patologica del soggetto si possono rilevare dati indicativi di una possibile immunodeficienza secondaria, quali compor-

tamenti o situazioni a rischio per infezione da HIV (rapporti etero- o omo-sessuali non protetti, tossicodipendenza con uso di droghe per via iniettiva, trasfusioni di sangue, infusioni di emoderivati) o uso di farmaci immunosoppressori, ecc. In particolare una storia che riveli anomala suscettibilità alle infezioni deve essere considerata con attenzione ed il tipo di patogeni responsabili degli episodi infettivi e le sedi coinvolte devono essere valutate attentamente, poiché possono orientare sul tipo di deficit immunitario. Per tale motivo una particolare cura deve essere rivolta allo studio di questi elementi utilizzando i supporti che la microbiologia (esami microscopici e colturali su campioni biologici e test sierologici, ove attendibili,) e la diagnostica per immagini (ecografia, radiografia, TC e RM) mettono a disposizione del curante per la loro definizione.

Si deve tuttavia tenere presente che non esistono criteri validi per definire il limite di "normalità" del numero degli episodi infettivi; in particolare nell'infanzia, quando il bambino inizia a vivere in comunità e ad avere contatti con i coetanei, il verificarsi di episodi di infezioni ricorrenti è un evento para-fisiologico. In questo senso la guida viene dall'esperienza clinica, che deve tener conto dell'età, area geografica, stato sociale e dimensioni della famiglia (numero di fratelli, anziani o extra-comunitari conviventi, ecc.). Più significative risultano in-

Tab. XXXIV. Principali dati anamnestici e manifestazioni cliniche che suggeriscono una possibile immunodeficienza (ID)

-
- Anamnesi familiare positiva per ID primitiva accertata o sospetta
 - Rilievo anamnestico di situazioni in cui è nota la possibile evenienza di una ID secondaria (ad es. comportamenti a rischio per infezione da HIV, uso di farmaci immunosoppressori, ecc.)
 - Infezioni croniche
 - Infezioni gravi, complicate o ricorrenti (più frequenti della norma)
 - Guarigione incompleta tra i diversi episodi infettivi o risposta incompleta al trattamento
 - Complicanze (o lenta risoluzione) delle comuni malattie dell'infanzia
 - Infezioni indotte da vaccini batterici o virali vivi attenuati
 - Presenza di infezioni o neoplasie "opportunistiche"
 - Ritardo nell'accrescimento, distrofia cutanea, diarrea, febbre, astenia, calo ponderale
 - Manifestazioni cliniche caratteristiche associate con particolari ID primitive
-

Tab. XXXV. Segni obiettivi frequentemente associati con immunodeficienze primitive o secondarie

Segno	Immunodeficienza
Albinismo oculo-cutaneo parziale	Sindrome di Chediak-Higashi
Ascessi cutanei ed eczema	Sindrome Iper-IgE
Ascessi cutanei e piodermite	Malattia granulomatosa cronica
Atassia	Atassia teleangectasia
Atrofia ottica o demenza (post-encefalite)	Agammaglobulinemia
Candidosi cutanea, cherato-congiuntivite, alopecia	Deficit di carbossilasi biotino-dipendenti
Candidosi mucocutanea	Candidosi mucocutanea cronica deficit dell'immunità cellulare
Eczema periorifitiale, paronichia perdita di capelli, lesioni psoriasiche alle estremità	Acrodermatite enteropatica
Edema angioneurotico	Deficit di C1-inibitore
Lesioni lichenoidi, alopecia, dermatite esfoliativa	GVHD cronica, S. di Omenn
Nanismo armonico	Agammaglobulinemia con deficit di GH
Nanismo ad arti corti, apparato pilifero rado e sclerotato	Ipoplasia delle cartilagini e del sistema pilifero
Petecchie ed eczema	S. di Wiskott-Aldrich
Sarcoma di Kaposi	AIDS
Teleangectasie	Atassia-teleangectasia
Tetania neonatale e alterazioni embriogenetiche particolari	S. di Di George

vece le informazioni che derivano da gravità, sede e tipo dell'infezione; in alcuni casi si possono rilevare complicanze dopo le comuni malattie dell'infanzia od infezioni clinicamente rilevanti dopo vaccinazioni con vaccini vivi attenuati (che non andranno mai utilizzati quando esistano già elementi che possono far sospettare un deficit immunitario).

Accanto alle infezioni, i pazienti con immunodeficienza possono presentare altri problemi, quali ritardi nell'accrescimento, malassorbimento, diarrea, manifestazioni cutanee, disordini ematologici o neoplasie linforeticolari, artriti, fenomeni allergici o autoimmuni (Tabella XXXIV). In particolare alcune forme di immunodeficienza primitiva o secondaria si associano a manifestazioni cliniche ben definite rilevabili all'esame obiettivo che costituiscono elementi caratteristici, in certi casi, di un vero e proprio "quadro sindromico", e che consentono una diagnosi quasi immediata; i principali di questi segni obiettivi che orientano fortemente verso determinate immunodeficienze primitive o secondarie sono elencati nella Tabella XXXV.

L'esame obiettivo dovrà studiare con particolare attenzione la cute, gli annessi cutanei, lo scheletro e le mucose visibili ed andranno valutati con attenzione gli organi linfoidi accessibili all'esame fisico, quali le tonsille ed i linfonodi.

Anche se le diverse componenti del sistema immunitario intervengono unitariamente nei meccanismi di difesa e in patologia esistono frequenti sovrapposizioni cliniche tra immunodeficienze a carico di settori diversi, per l'inquadramento dei deficit e del tipo di indagini da eseguire per lo studio funzionale del sistema immunitario, può essere utile mantenere una suddivisione che distingue:

1. immunità umorale (Ig/anticorpi e linfociti B);
2. immunità cellulare (linfociti T e cellule NK);
3. sistema fagocitario (granulociti neutrofili e macrofagi);
4. sistema del complemento.

I difetti dell'immunità umorale provocano infezioni ricorrenti che generalmente coinvolgono l'apparato respiratorio, i seni paranasali, l'orecchio medio e sono provocate da batteri capsulati extracellulari, quali l'*Haemophilus influenzae*, lo *Streptococco* e lo *Stafilococco*. Le difese immunitarie contro tali patogeni sono in gran parte legate alla produzione di anticorpi verso antigeni capsulari composti da carboidrati che permettono l'opsonizzazione e la successiva eliminazione del batterio da parte delle cellule fagocitarie. Nei pazienti con deficit dell'immunità umorale si manifesta inoltre un'aumentata incidenza di infezioni intestinali provocate da alcuni virus, enterovirus soprattutto, o da protozoi, *Giardia lamblia* in particolare (Tabella XXXVI).

Tab. XXXVI. Principali patogeni responsabili di infezione nei diversi tipi di deficit del sistema immunitario

Deficit dell'immunità umorale	Deficit dell'immunità cellulare
Virus	Virus
- Enterovirus (ECHO, ecc.)	- Herpesvirus hominis 1 e 2
- Poliovirus	- Virus varicella Zoster
- Virus varicella Zoster	- Cytomegalovirus
- Virus vaiolo vaccino	- Virus di Epstein-Barr
Batteri	Batteri
- Haemophilus influenzae	- Listeria monocytogenes
- Streptococcus pneumoniae	- Legionella micdadei
- Staphylococcus aureus	- Mycobacterium tuberculosis
- Neisseria meningitidis	- M. avium
- Enterobacteriaceae	- BCG
- Klebsiella pneumoniae	- Enterobacteriaceae
- Pseudomonas aeruginosa	
Protozoi	Miceti
- Giardia lamblia	- Cryptococcus neoformans
- Pneumocystis carinii	- Histoplasma capsulatum
- Toxoplasma gondii	- Coccidioides
- Cryptosporidium	- Nocardia asteroides
	- Candida albicans
	- Mucor, Rhizopus
Deficit del sistema fagocitario	Protozoi
Batteri	- Pneumocystis carinii
- Staphylococcus aureus	- Toxoplasma gondii
- Enterobacteriaceae	- Cryptosporidium
- Klebsiella pneumoniae	
- Pseudomonas aeruginosa	Elminti
- Streptococcus pneumoniae	- Strongyloides stercoralis
Miceti	
- Candida albicans	Deficit del complemento
- Aspergillus spp	Batteri
- Mucor, Rhizopus	- Neisseria meningitidis (a,b)
	- Streptococcus pneumoniae (a)
	- Neisseria gonorrhoeae (b)

(a = deficit di C3) (b = deficit dei componenti C5-C9)

Nei pazienti con deficit dell'immunità cellulare le infezioni ricorrenti sono provocate, in modo caratteristico, da quei patogeni, virus - batteri - miceti - protozoi, oggi comunemente definiti agenti opportunisti e ben noti come complicanze infettive dell'infezione da HIV, di cui gli esempi più tipici sono il Cytomegalovirus, i Micobatteri atipici, la Candida albicans e lo Pneumocystis carinii. Ciò consegue al fatto che l'immunità cellulo-mediata svolge un ruolo essenziale nella difesa dell'organismo nei confronti dei patogeni intracellulari, molti dei quali non sono in grado di provocare infezioni clinicamente rilevanti nell'ospite immunocompetente (Tabella XXXVI).

Le alterazioni del sistema fagocitario, soprattutto quelle a carico dei neutrofili, provocano ricorrenti ascessi cutanei, polmoniti, osteomieliti, periodontiti e, più raramente, sepsi. Tali patologie sono spesso causate da batteri quali gli Stafilococchi, o miceti come la Candida albicans (Tabella III).

I difetti del complemento, composto da una serie di fattori circolanti che si attivano a cascata, hanno contribuito a chiarire il ruolo di questo sistema

nella risposta immune (opsonizzazione, chemiotassi, mediatori della flogosi, lisi). I deficit di C3 provocano infezioni polmonari, dei seni paranasali e sepsi da parte di batteri capsulati, con quadri simili a quelli delle gravi immunodeficienze dell'immunità umorale, a testimonianza del ruolo della opsonizzazione mediata da C3 nella eliminazione di questi patogeni da parte dei fagociti. Nei deficit delle ultime componenti del complemento, che costituiscono il sistema litico, si verificano invece infezioni ricorrenti o meningiti da parte di Neisserie; ciò indica l'importanza dell'attività batteriolitica complemento-mediata nella difesa dell'organismo normale da questi batteri (Tabella III). Oltre a particolari infezioni, anche la presenza di malattie autoimmuni come il LES può orientare verso deficit dei primi fattori del complemento.

Sulla base dei rilievi emersi dall'insieme dei dati anamnestici e di quelli derivati dall'esame obiettivo si potrà procedere agli accertamenti in vitro od in vivo per la valutazione funzionale del sistema immunitario in modo, almeno in parte, mirato.

ESAMI DI PRIMO LIVELLO PER LA VALUTAZIONE FUNZIONALE DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Quando si sospetti una immunodeficienza, nella programmazione delle indagini è opportuno attenersi ad un criterio di gradualità. Alcuni esami di laboratorio semplici e relativamente poco costosi devono essere considerati, anche sulla base di suggerimenti dell'OMS, come indagini di "primo livello". In alcuni casi tali indagini consentono già di porre diagnosi, altrimenti il risultato orienta in maniera più precisa verso la componente del sistema immunitario da investigare con gli accertamenti più complessi (Tabella XXXVII).

L'esame emocromocitometrico con formula leucocitaria consente una valutazione numerica di linfociti, neutrofili e monociti, oltre che degli eosinofili e basofili. Una conta linfocitaria inferiore a 1000 elementi/mm³ suggerisce un possibile deficit dei linfociti T (che costituiscono normalmente il 60-80% dei linfociti circolanti), quale quello che si riscontra in immunodeficienze (ID) primitive combinate, o in forme di ID specifiche dell'immunità cellulo-mediata, e nelle ID acquisite come l'AIDS che colpiscono principalmente questo settore. Dalla formula è possibile anche evidenziare neutropenia (<1500/mm³), che possono riscontrarsi in ID primitive o secondarie del sistema fagocitario o in ID combinate.

L'esame emocromocitometrico inoltre consente di diagnosticare quadri di anemia che si possono manifestare in forme di ID Grave Combinata o costituiscono elemento caratteristico di ID particolari, come il Deficit di transcobalamina 2, che si accompagna ad una anemia megaloblastica.

Dall'esame emocromocitometrico si ottengono anche importanti informazioni sulle piastrine; una riduzione numerica e del volume di questi elementi è caratteristica di un'importante ID primitiva, la sindrome di Wiskott-Aldrich.

L'elettroforesi delle proteine sieriche, associata al loro dosaggio quantitativo, fornisce utili informazioni sui livelli complessivi delle immunoglobuline, che migrano in gran parte nel picco elettroforetico delle γ -globuline. Pertanto riduzioni di tale componente delle proteine circolanti, in particolare livelli di γ -globuline inferiori a 500 mg/dl, dovranno essere considerati con attenzione (Figura 32). Ovviamente nella valutazione del risultato andranno tenute ben presenti le variazioni fisiologiche legate, ad esempio nei primi mesi di vita, alla progressiva riduzione delle Ig trasmesse dalla madre per via transplacentare ed alla graduale maturazione del siste-

Tab. XXXVII. Accertamenti di "primo livello" per la valutazione funzionale del sistema immunitario

- Esame emocromocitometrico con formula leucocitaria (conta assoluta di linfociti, neutrofili, monociti, valutazione di emazie e piastrine)
- Elettroforesi delle proteine sieriche (valutazione dei livelli di gamma-globuline in relazione all'età e in rapporto con quelli dell'albumina)
- Dosaggio delle singole classi di Ig sieriche (IgG, IgA, IgM) mediante immunodiffusione radiale o nefelometria, IgE mediante RIA o ELISA
- Titolazione delle isoemoagglutinine (o eteroagglutinine) sieriche
- Test cutanei di ipersensibilità ritardata nei confronti di "antigeni di richiamo"
- Valutazione morfologica delle cellule fagocitarie all'esame microscopico dello striscio di sangue periferico
- Attività emolitica totale del siero (test CH50)
- Accertamenti di diagnostica per immagini (Rx, TC o RM del torace)

Altre indagini

Test sierologici per l'infezione da HIV

ma anticorpale del bambino. Un altro elemento che deve essere valutato nell'elettroforesi delle proteine è la presenza di una eventuale concomitante ipoalbuminemia, che può far sospettare una situazione di ipogammaglobulinemia secondaria a perdite (enteropatie proteino-disperdenti, nefropatie), e non a deficit di sintesi anticorpale. L'elettroforesi delle proteine sieriche è inoltre esame di "screening" fondamentale per svelare alterazioni funzionali del sistema anticorpale di natura diversa dalle immunodeficienze, quali la sintesi anomala di proteine mielomatose, cui peraltro può associarsi un quadro di immunodeficienza secondaria.

Informazioni più precise sulla funzionalità del sistema di risposta umorale sono fornite dal dosaggio della concentrazione nel siero delle diverse classi di immunoglobuline. I livelli delle classi maggiori, IgG, IgA e IgM vengono determinati con tecniche semplici, soprattutto mediante immunodiffusione radiale o nefelometria, mentre per il dosaggio delle IgE si fa ricorso generalmente a metodiche radioimmunologiche od immunoenzimatiche. I valori riscontrati devono essere confrontati con quelli normali per l'età del paziente indicati dal singolo laboratorio. Tali indagini sono oggi alla portata di quasi tutti i laboratori e consentono di porre diagnosi di Agammaglobulinemia, di Deficit di IgA, di Immunodeficienza Comune Variabile o di Sindrome Iper-IgM. Si deve tener conto che esiste una notevole variabilità dei risultati tra individuo ed individuo, ma valori di IgG inferiori ai 300 mg/dl sono fortemente sospetti per un deficit importante a carico di questa classe e al di sotto di questa soglia, soprattutto

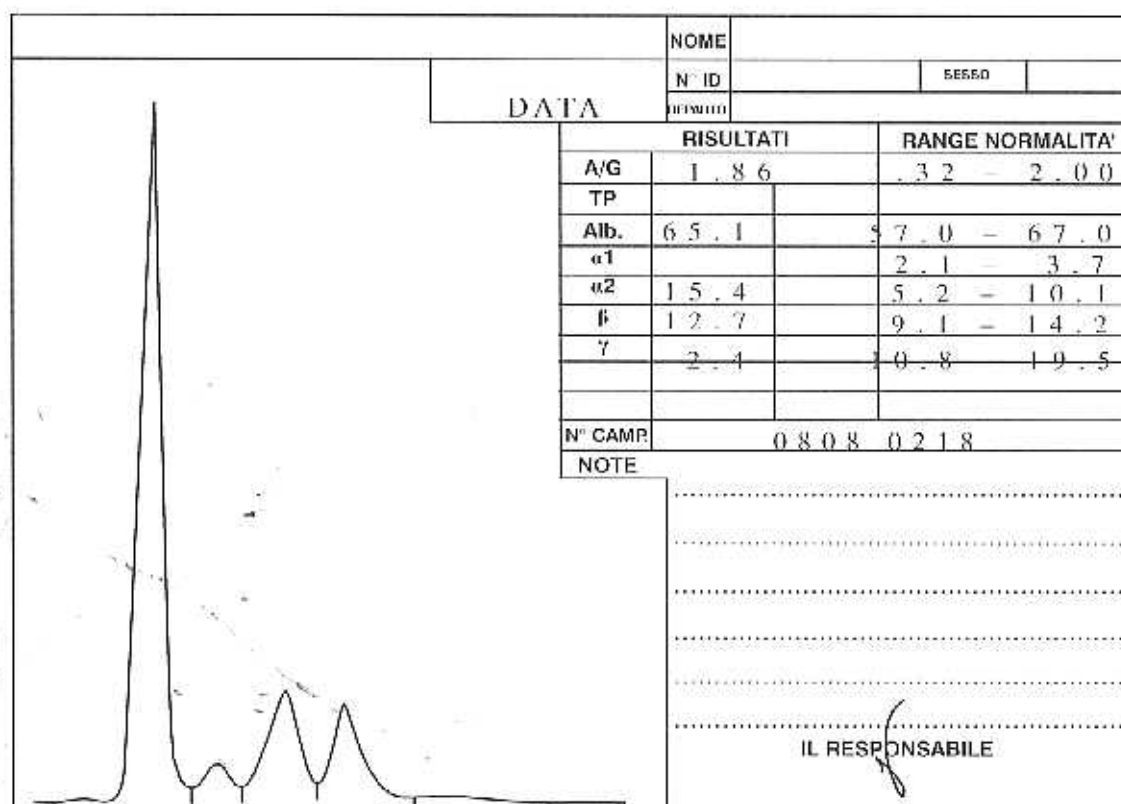


Fig. 32: Tracciato elettroforetico delle proteine sieriche di un paziente con immunodeficienza Comune Variabile; il quadro è caratterizzato da grave ipogammaglobulinemia (2,4% delle proteine totali).

to se si associano infezioni ricorrenti, deve essere considerata la possibilità di iniziare una terapia sostitutiva mediante infusione di gammaglobuline. Il riscontro di livelli abnormemente elevati di IgE sieriche, se associato alle altre manifestazioni caratteristiche, può orientare invece verso la diagnosi di una Sindrome Iper-IgE.

La capacità di sviluppare una risposta anticorpale specifica può essere studiata in maniera semplice, seppure parziale, mediante la titolazione delle isoemoagglutinine sieriche che viene eseguita generalmente presso i centri trasfusionali. Tale indagine valuta principalmente una risposta anticorpale specifica IgM, ma presenta alcune limitazioni. Le isoemoagglutinine sono fisiologicamente assenti nei primi mesi di vita e divengono evidenziabili a partire dal 3°-6° mese; la titolazione di questi anticorpi riveste un significato diagnostico certo soltanto dopo i due anni di età, quando tutti i soggetti normali hanno nel siero livelli misurabili di isoemoagglutinine. Negli individui di gruppo sanguigno AB non sono presenti anticorpi né anti-A, né anti-B, e pertanto in questo caso la titolazione delle isoemoagglutinine non è in grado di fornire informazioni.

In questi soggetti possono essere titolati i livelli delle agglutinine eterofile, che appartengono anch'esse alla classe IgM, e sono capaci di reagire con emazie eterologhe, soprattutto le emazie di montone.

Un importante e semplice strumento di valutazione dell'immunità cellulo-mediata è rappresentato dall'esecuzione in vivo dei test cutanei di ipersensibilità ritardata nei confronti di "antigeni di richiamo". Questa indagine, il cui prototipo è storicamente rappresentato dall'intradermoreazione "alla Mantoux", è alla portata di qualsiasi struttura sanitaria per la sua semplicità di esecuzione ed il basso costo; si basa sullo studio della risposta infiammatoria cutanea che si verifica dopo 48-72 ore dall'iniezione intradermica di un antigene incontrato in precedenza. Per il test possono essere utilizzati antigeni ai quali la popolazione è comunemente esposta od antigeni per i quali sia avvenuta un'immunizzazione attiva. Generalmente, per avere la certezza dell'avvenuta immunizzazione del paziente in esame, è consigliabile basarsi su dati anamnestici certi (ma anche dopo le comuni vaccinazioni una piccola percentuale di soggetti normali non sviluppa immunità) o, più opportunamente, usare un

adeguato numero di antigeni. I più comunemente utilizzati sono tossoide tetanico e difterico, antigeni streptococcici, PPD, Candida, Tricophyton, Proteus, e antigene parotitico. In alcuni casi si può effettuare l'esame 15-20 giorni dopo aver sottoposto il paziente ad immunizzazione attiva mediante vaccinazione con tossoide tetanico e difterico (che si possono somministrare senza problemi anche a soggetti nei quali si sospetti un'immunodeficienza). Per i test di ipersensibilità ritardata, in alternativa all'iniezione intradermica che consente l'uso di quantità certe di ciascun antigene (ed è pertanto meglio standardizzabile), sono disponibili in commercio applicatori in plastica monouso dotati di più testine imbevute ognuna con un antigene diverso. Tali applicatori sono simili a quello del Tine-test per l'applicazione della PPD. Nell'esecuzione dell'esame con qualsivoglia metodica e nella valutazione dei risultati è necessaria particolare attenzione. Infatti, anche se il test è utilizzato principalmente come strumento per lo studio dell'immunità cellulo-mediata, si deve ricordare che i meccanismi coinvolti nello sviluppo della risposta cutanea sono complessi. Intervengono infatti la presentazione dell'antigene da parte delle "antigen presenting cell", il riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti T richiamati in sede, l'attivazione e la proliferazione di questi ultimi e la loro funzione effettrice mediante produzione di citochine, che si estrinseca anche attraverso la partecipazione al processo di altre cellule (monociti-macrofagi in primo luogo). Pertanto un risultato negativo od una riduzione di risposta nel test può conseguire ad alterazioni a carico di uno dei molteplici livelli sopra menzionati, la cui precisazione richiede l'impiego di tecniche più sofisticate. Per contro, il riscontro dopo 48-72 ore di una risposta positiva anche se singola, rappresentata dalla presenza di una papula con infiltrato cutaneo (di diametro medio superiore ai 2 mm se si è usato l'applicatore, ai 5 mm se si è praticato l'inoculo intradermico), generalmente accompagnato da eritema, indica che tutti i meccanismi sopra citati possono essere considerati funzionalmente entro i "limiti di normalità".

Per la valutazione del sistema fagocitario i test di screening sono rappresentati dalla già ricordata conta dei neutrofili e dei monociti all'esame emocromocitometrico, che svela le alterazioni numeriche caratteristiche di immunodeficienze primitive o secondarie, cui si deve associare l'analisi della morfologia dei neutrofili all'esame microscopico dello striscio di sangue periferico. Alterazioni dei granuli dei neutrofili sono fortemente sospette per la pre-

senza di un immunodeficit che coinvolge queste cellule, quali la Sindrome di Chediak-Higashi o il Difetto della formazione dei granuli secondari.

Per lo studio di primo livello del sistema del complemento un test di ampia diffusione presso i laboratori di chimica-clinica o di microbiologia è rappresentato dallo studio dell'attività emolitica totale (CH50). In questo test vengono generalmente utilizzate come cellule bersaglio globuli rossi di montone ("sheep red blood cells" -SRBC) che sono stati precubati (sensibilizzati) con anticorpi IgM anti-SRBC. A tale sistema rivelatore viene aggiunto il siero del paziente in esame od un siero di controllo che fungono da sorgente di complemento. La reazione viene misurata mediante valutazione spettrofotometrica dell'emoglobina che si libera nel sovrantante e che riflette il grado di lisi dei globuli rossi di montone. I risultati sono espressi come l'inverso della diluizione del siero che provoca la lisi del 50% dei globuli rossi. In questo sistema il complesso antigene-anticorpo rappresentato dall'emazia sensibilizzata attiva il complemento attraverso la via classica, con attivazione sequenziale di C1, C4, C2, che porta alla formazione della C3 convertasi della via classica. In sequenza si innescano le fasi ulteriori di attivazione della cascata complementare fino alla formazione del complesso C5b6789 o MAC ("membrane attack complex") che provoca la lisi osmotica della cellula bersaglio.

Per la valutazione della via alternativa si può usare un sistema simile, in cui le cellule bersaglio sono costituite da emazie di coniglio (non sensibilizzate) che hanno la peculiarità di favorire la deposizione in membrana del C3b, con conseguente formazione della C3 convertasi della via alternativa (C3bBb). La successiva attivazione del sistema fino alla formazione del MAC conduce anche qui alla lisi degli eritrociti di coniglio, se sono presenti tutti i fattori necessari (in questo caso anche i fattori B e D, non coinvolti nella via classica).

Si deve ricordare che valori normali del CH50 possono riscontrarsi anche in malattie associate a ridotta sintesi od aumentato consumo di uno o più fattori del complemento, poiché l'attività complementare totale in questi sistemi non è direttamente proporzionale alla concentrazione dei singoli fattori nel siero (riduzioni anche del 50% di uno o più fattori sono compatibili con un risultato normale o solo lievemente ridotto). Tuttavia la mancanza completa di un fattore, come avviene nelle immunodeficienze primitive a carico del sistema complementare, provoca costantemente una riduzione del CH50.

Nella valutazione del paziente, soprattutto se in

età pediatrica, in cui si sospetti la presenza di una immunodeficienza, tra le indagini di primo livello vanno inclusi alcuni accertamenti di diagnostica per immagini. Tra questi la radiografia o, meglio, la TC o la risonanza magnetica del torace possono documentare l'assenza del timo, caratteristica della Sindrome di Di George, o riduzioni di volume di questo organo che possono verificarsi in caso di terapia steroidea protratta o nelle infezioni gravi. Tali indagini possono dare informazioni anche su eventuali quadri patologici a carico dell'apparato respiratorio conseguenti alle infezioni e su alterazioni scheletriche che si associano a forme particolari di ID primitive come la Immunodeficienza combinata da Deficit di adenosin-deaminasi o l'Ipoplasia delle cartilagini (e del sistema pilifero).

Pur non ricorrendo strettamente tra le tecniche utili per la valutazione funzionale del sistema immunitario, è necessario menzionare in questo paragrafo i test sierologici per l'infezione da HIV. Questi esami infatti sono entrati in questi ultimi anni, data la sempre maggiore diffusione dell'infezione, tra le indagini di primo livello che devono essere eseguite nei pazienti in cui si sospetti una immunodeficienza. Sulla base dei dati epidemiologici, l'infezione da HIV rappresenta attualmente la causa più frequente di immunodeficienza. Si deve tuttavia ricordare che queste, come le altre indagini sierologiche per la ricerca di infezioni, sono legate al rilievo di anticorpi specifici verso il patogeno e che per la produzione di tali anticorpi è necessario un sistema immunitario capace di sviluppare risposte anticorpali normali nei confronti di un antigene. Nei pazienti con sospetta o dimostrata alterazione della risposta anticorpale le indagini infettivologiche devono essere basate sull'impiego di metodi alternativi, non sierologici, capaci di individuare direttamente la presenza del patogeno (esami colturali, dimostrazione di materiale genetico del patogeno mediante PCR, ecc.).

ESAMI DI SECONDO LIVELLO PER LA VALUTAZIONE FUNZIONALE DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Quando gli accertamenti di primo livello hanno confermato il sospetto di una immunodeficienza, ma non hanno consentito di porre una diagnosi precisa, si deve proseguire l'iter diagnostico con accertamenti di secondo livello. In alcune situazioni si deve fare ricorso a tali indagini anche sulla base delle manifestazioni cliniche, poiché i test di primo livello possono presentare limiti diagnostici. È necessario ri-

cordare che alcune immunodeficienze primitive particolari possono essere presenti pur con risultati completamente normali dei test di "screening" fin qui ricordati. Ciò si verifica, ad esempio, nelle immunodeficienze del sistema anticorpale delle sotto-classi IgG meno rappresentate quantitativamente, nella Malattia Granulomatosa Cronica e nei Deficit funzionali granulocitari; inoltre il quadro di alcune immunodeficienze secondarie può provocare alterazioni funzionali del sistema immunitario più sfumate ed evidenziabili soltanto ricorrendo ad accertamenti più sofisticati. Nei prossimi paragrafi le indagini di secondo livello saranno considerate in base al settore di indagine verso cui sono rivolte, ma in questo paragrafo vengono fornite alcune elementari informazioni sulle principali tecniche impiegate nei principali di questi test.

Citofluorimetria a flusso

In numerose situazioni la citofluorimetria a flusso ha sostituito l'analisi in microscopia a fluorescenza nella rilevazione su cellule in sospensione di marcatori evidenziabili principalmente mediante anticorpi coniugati con fluorocromi. Rispetto alla microscopia questa metodica presenta alcuni vantaggi: 1) analisi di un numero notevolmente superiore di cellule e, quindi maggior precisione dei risultati, soprattutto quando vengano esaminati marcatori espressi su piccoli numeri di cellule; 2) l'intensità di fluorescenza emessa è analizzata in maniera quantitativa ed obiettiva e ciò elimina i problemi legati alla soggettività di analisi dell'occhio umano nell'esame al microscopio, soprattutto nel caso di marcatori espressi a bassa densità dalle cellule; 3) possibilità di analizzare contemporaneamente sullo stesso campione l'espressione di più marcatori (fino a 3 con i citofluorimetri attualmente più diffusi), fatto che consente, a seconda dei marcatori scelti per l'indagine, di studiare contemporaneamente la presenza nel campione di popolazioni cellulari diverse, impiegando anticorpi che riconoscono marcatori espressi dalle cellule in maniera mutualmente esclusiva, oppure di rilevare l'espressione contemporanea sulla stessa cellula di marcatori diversi, che ne possono identificare l'appartenenza ad una certa linea o ad un certo stato funzionale. Nei citofluorimetri a flusso si possono identificare tre componenti: 1) la fluidica che è strutturata in modo da portare le cellule in sospensione nel campione in un flusso ordinato alla camera di conta, dove avviene l'interazione con la luce laser; 2) la parte ottica, costituita da sorgenti luminose la-

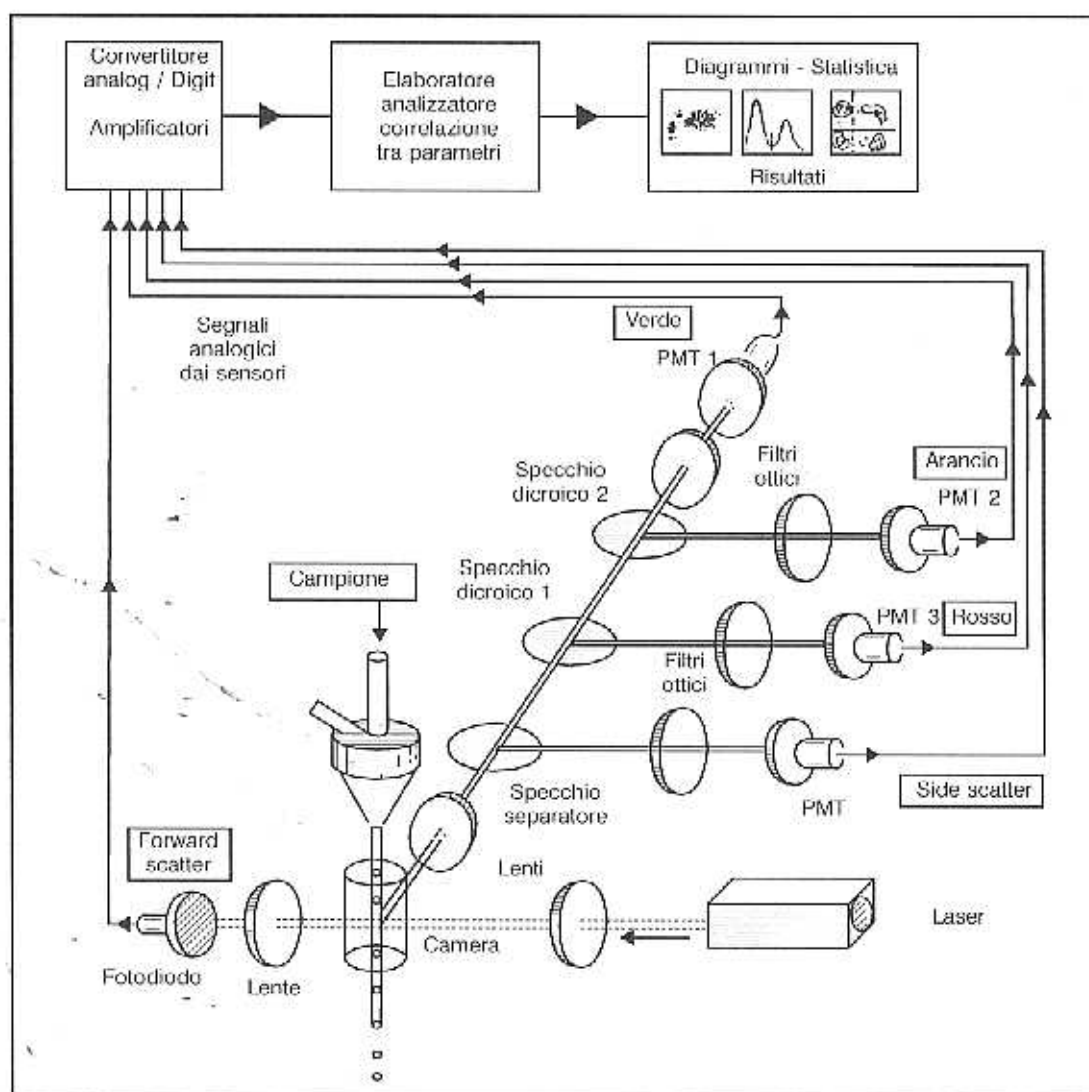


Fig. 33: Rappresentazione schematica di un citofluorimetro a flusso. Sono rappresentate: la componente fluidica, che porta le cellule del campione in flusso ordinato alla camera di conta; la componente ottica che genera il segnale luminoso e rileva come questo è modificato dall'interazione con la cellula e i fluorocromi ad essa legati; la componente elettronica che rileva, elabora e memorizza per ogni singola cellula i diversi parametri che la identificano e caratterizzano.

ser di opportuna lunghezza d'onda, un sistema di specchi, lenti e filtri e alcuni sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che sono in grado di trasformare il segnale luminoso emesso dalla cellula che interagisce con la luce laser in un segnale elettrico; 3) la componente elettronica che trasforma il segnale elettrico analogico emesso dai fotodiodi e fotomoltiplicatori in un segnale digitale che viene elaborato elettronicamente dal computer e memorizzato (Figura 33). Nei citofluorimetri a flusso per ogni cellula che interagisce con la luce laser si ottengono, attraverso i sensori che possono rilevare i segnali luminosi a diverse lunghezze d'onda, diverse informazioni (parametri). La rilevazione della luce laser alla stessa

lunghezza d'onda della sorgente luminosa consente di acquisire informazioni sulla luce diffratta, refratta o riflessa da parte della cellula. Tali elementi sono definiti "parametri intrinseci" perché consentono di identificare la cellula sulla base delle sue caratteristiche peculiari, quali le dimensioni (rilevate dal cosiddetto "forward scatter") e la complessità della membrana, del nucleo e del citoplasma (rilevato dal "side scatter"). Sulla base dei parametri intrinseci le diverse componenti cellulari nel campione in esame possono essere identificate in maniera sostanzialmente simile a quanto avviene nei contaglobuli automatizzati predisposti a fornire la formula leucocitaria; così, ad esempio, in un campione di sangue

“intero” dopo la lisi eritrocitaria si possono distinguere i linfociti, i monociti ed i granulociti (Figura 34). Con l'impiego dei programmi della componente elettronica è possibile analizzare nell'ambito delle diverse popolazioni cellulari quella che interessa per l'espressione degli altri parametri (parametri estrinseci). I parametri estrinseci sono rappresentati dal segnale luminoso a diverse lunghezze d'onda emesso dai fluorocromi coniugati agli anticorpi utilizzati per il riconoscimento di marcatori presenti sulla cellula. Con l'uso di antisieri o anticorpi monoclonali marcati con differenti fluorocromi è possibile ottenere, per ognuno di essi un segnale numerico proporzionale alla luce emessa dalla singola cellula alle diverse lunghezze d'onda, che a sua volta è proporzionale all'espressione dell'antigene riconosciuto dallo specifico anticorpo. Si possono così avere informazioni, per ogni cellula sulla densità di espressione di un marcatore sulla membrana cellulare (Figura 35) o, sottoponendo il campione ad appropriate procedure, all'interno della cellula stessa. L'impiego contemporaneo di due o tre anticorpi diversi rivolti verso differenti marcatori e coniugati con fluorocromi che emettono a diversa lunghezza d'onda (generalmente isotiocianato di fluoresceina - FITC, ficocitrina - PE e proteinaperidina-clorofilla - PerCP) consente una valutazione quantitativa di componenti cellulari diverse nello stesso campione. Ad esempio nell'ambito dei linfociti è possibile valutare la percentuale di cellule T (CD3⁺) e B (CD19⁺) (Figura 36). In alternativa, con lo stesso sistema, si può studiare l'espressione di due diversi marcatori espressi

sulla stessa cellula; ciò può permettere ad esempio di precisare lo stadio maturativo o la fase funzionale di una determinata popolazione cellulare (Figura 37). La citofluorimetria a flusso costituisce oggi l'indagine di laboratorio fondamentale per la valutazione quantitativa nel sangue periferico o su campioni di altra origine di cellule delle principali popolazioni o sottopopolazioni linfocitarie o delle cellule NK.

Oltre a questo impiego più diffuso, con la citofluorimetria sono possibili studi sul contenuto in acidi nucleici o in proteine della cellula utilizzando appropriati marcatori fluorescenti. In questo modo si possono avere informazioni sulla ploidia cellulare di una particolare popolazione (ricerca e quantizzazione di eventuali cellule aneuploidi) o sulla collocazione delle cellule di una popolazione nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

Indagini genetiche e molecolari

Southern blotting

Il “southern blotting” consente l'analisi del DNA dopo che questo è stato frammentato da enzimi di restrizione, particolari endonucleasi di origine batterica che “tagliano” il DNA in corrispondenza di sequenze nucleotidiche diverse per ciascun enzima. Dopo la frammentazione il DNA è sottoposto a elettroforesi su gel che separa i frammenti in base alle loro dimensioni ed i frammenti separati possono essere denaturati e trasferiti su membrane di nitrocellulosa o di

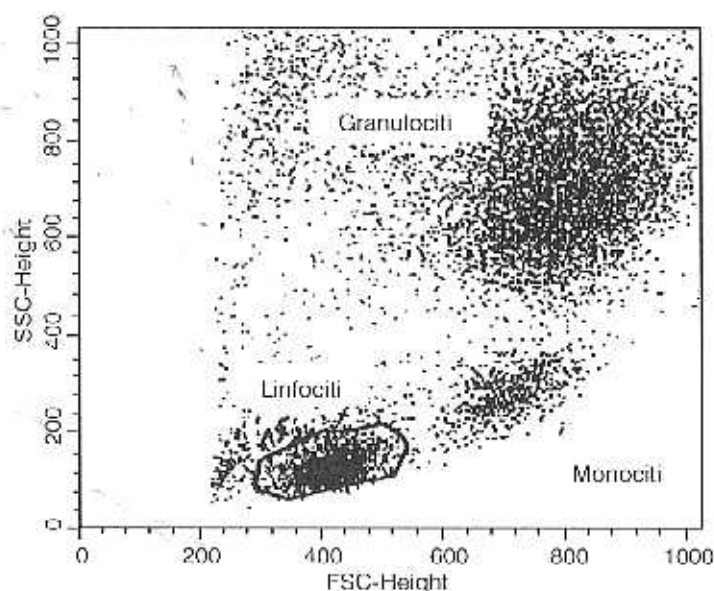
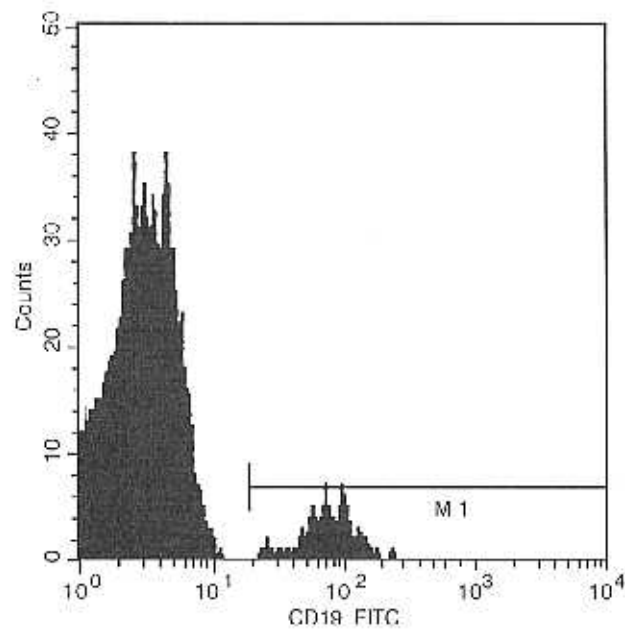


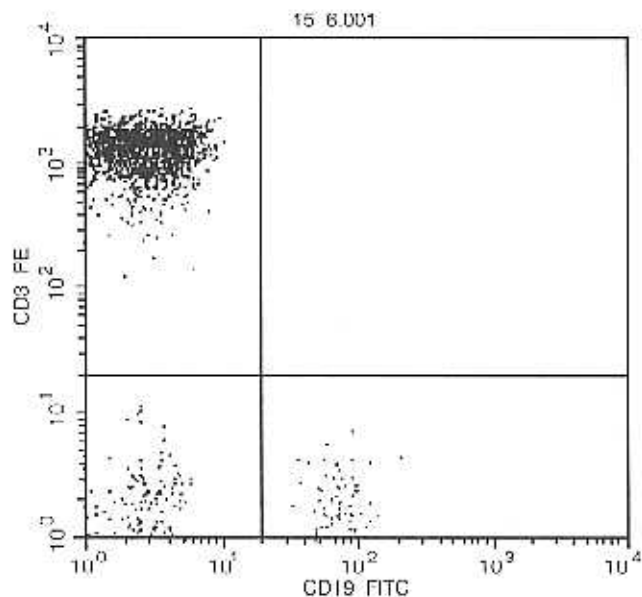
Fig. 34: Grafico ottenuto dall'analisi biparametrica in citofluorimetria dei parametri intrinseci ("citogramma") delle cellule di sangue periferico dopo lisi eritrocitaria. Le diverse componenti cellulari dei leucociti, linfociti, granulociti e monociti possono essere individuate sulla base delle caratteristiche intrinseche citofluorimetriche e ciò consente un'analisi differenziata sulla popolazione in esame per lo studio dell'espressione di uno o più marcatori individuabili con l'impiego di anticorpi specifici marcati con fluorocromi. Viene indicata la finestra di analisi sulle popolazioni linfocitarie.

Fig. 35: Grafico relativo all'analisi mediante citofluorimetria a flusso dell'espressione di un marcatore sulla superficie cellulare ("Istogramma monoparametrico"). In ascissa è riportata l'intensità di fluorescenza, mentre l'ordinata è espresso il numero di cellule. Con tale tipo di indagine è possibile studiare la percentuale di cellule che, nell'ambito della popolazione in esame, esprimono un particolare marcatore individuabile con l'uso di un anticorpo fluoresceinato e la densità di espressione, che è proporzionale all'intensità di fluorescenza. Il test è inoltre idoneo a studiare in condizioni di base, e dopo stimolo, le modificazioni dell'espressione di un marcatore rispetto ai "controlli". Il grafico qui riportato si riferisce alle cellule che esprimono il CD19, marcatore dei linfociti B, nell'ambito dei linfociti totali.



Marker	Left	Right	Events	% Gated
All	1	9910	4548	100.00
M1	19	9910	231	5.08

Fig. 36: Grafico ottenuto dall'analisi biparametrica in citofluorimetria dell'espressione di due marcatori individuabili mediante anticorpi monoclonali marcati con fluorocromi differenti su una popolazione cellulare. In questi citogrammi, in ascissa è indicata l'intensità di fluorescenza verde (isotiocianato di fluoresceina FITC), in ordinata l'intensità di fluorescenza arancione (ficoeritrina-PE). Ogni punto del citogramma corrisponde alla collocazione nel grafico di ogni cellula analizzata sulla base di questi due parametri. Nell'analisi si ottengono quattro quadranti: quello in basso a sinistra in cui sono comprese le cellule che non esprimono i marcatori in esame (cellule -/-); quello in basso a destra che comprende le cellule positive per il marcatore riconosciuto dagli anticorpi marcati con FITC (cellule -/+); quello in alto a sinistra dove si posizionano le cellule positive per il marcatore riconosciuto dagli anticorpi marcati con PE (cellule +/-); quello in alto a destra che comprende le cellule che coesprimono i due marcatori (cellule +/+). Se si utilizzano anticorpi che riconoscono molecole espresse da popolazioni linfocitarie in maniera mutualmente esclusiva, questo tipo di indagine consente di quantizzare su un singolo campione le percentuali di cellule appartenenti alle due popolazioni. In questo grafico vengono mostrati linfociti T CD3+ (marcati con PE) e B CD19+ (marcati con FITC).



Quad	Events	% Gated
UL	4081	89.29
UR	0	0.00
LL	256	5.63
LR	231	5.08

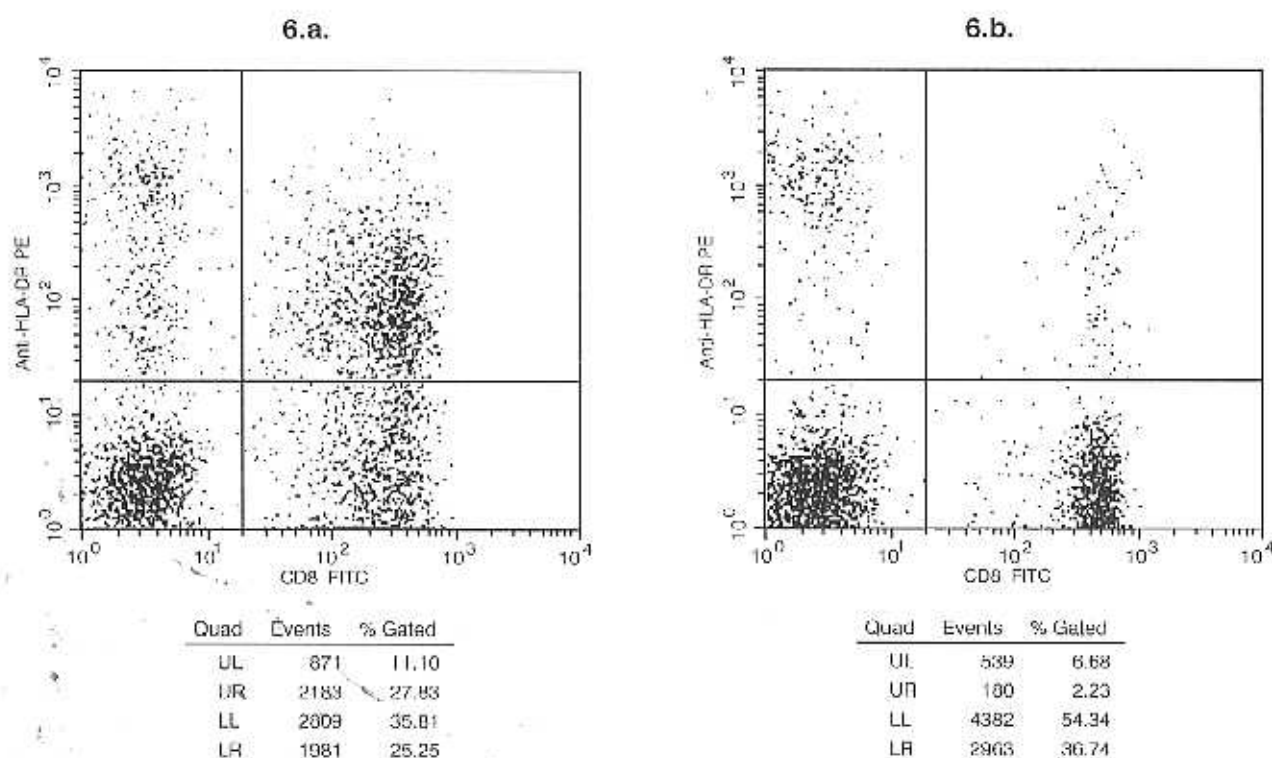


Fig. 37: Grafici ottenuti dall'analisi biparametrica in citofluorimetria dell'espressione di due marcatori individuabili mediante anticorpi monoclonali marcati con fluorocromi differenti su una popolazione cellulare. In questi citogrammi, in ascissa è indicata l'intensità di fluorescenza verde (isotiocianato di fluoresceina-FITC), in ordinata l'intensità di fluorescenza arancione (ficeotrina-PE). Ogni punto del citogramma corrisponde alla collocazione nel grafico di ogni cellula analizzata sulla base di questi due parametri; nell'analisi si ottengono quattro quadranti: quello in basso a sinistra in cui sono comprese le cellule che non esprimono i marcatori in esame (cellule -/-); quello in basso a destra che comprende le cellule positive per il marcatore riconosciuto dagli anticorpi marcati con FITC (cellule +/-); quello in alto a sinistra dove si posizionano le cellule positive per il marcatore riconosciuto dagli anticorpi marcati con PE (cellule -/+); quello in alto a destra che comprende le cellule che coesprimono i due marcatori (cellule ++). Questo tipo di indagine consente di valutare la coespressione di due marcatori sulla stessa popolazione cellulare. In questo caso è stata valutata l'espressione di un marcatore di attivazione dei linfociti T, l'antigene DR (PE), sui linfociti CD8⁺ (FITC) di un paziente con LES (6.a.) e in un soggetto normale di controllo (6.b.).

nylon. A questo livello, utilizzando appropriate sonde radiomarcate (cioè frammenti di DNA complementari alla sequenza del gene in esame) è possibile evidenziare in autoradiografia tra i frammenti trasferiti su membrana quelli specifici del gene in questione. Con l'applicazione di questa tecnica allo studio delle immunodeficienze è possibile diagnosticare alcune forme provocate dalla delezione totale del gene, che provoca l'assenza di segnale radioattivo all'autoradiografia. Sono inoltre evidenziabili grossolane alterazioni di un gene come inserzioni o delezioni parziali che provocano all'autoradiografia la marcatura di frammenti di dimensioni anomale, minori del controllo nel caso di delezioni, maggiori nel caso di inserzioni. Questa tecnica tuttavia non consente generalmente di evidenziare le mutazioni puntiformi, che sono provocate da alterazioni di un singolo nucleotide e che costituiscono la causa più frequente di mutazione. In questi casi solitamente l'alterazione non provo-

ca mutamenti delle dimensioni dei frammenti a meno che la mutazione non riguardi proprio i siti di restrizione del particolare enzima impiegato. Nello studio funzionale del sistema immunitario con la tecnica del Southern blot è possibile, ad esempio, identificare la delezione completa di uno dei geni che codificano per le catene pesanti delle immunoglobuline, alterazione che provoca un quadro di immunodeficienza primitiva del sistema anticorpale caratterizzato dall'assenza completa di una classe o sottoclasse Ig.

Un notevole progresso nello studio genetico, sia del DNA che del RNA è venuto dalla possibilità di ottenere un numero notevole di copie identiche di singoli frammenti del DNA mediante la reazione di polimerizzazione a catena (PCR). Con questa tecnica sono divenute disponibili rilevanti quantità di DNA purificato per analisi genetiche di sequenze nucleotidiche e per la identificazione di eventuali mutazioni. L'impiego della PCR è possibile anche

per l'amplificazione di sequenze di mRNA, mediante conversione di questo in cDNA con l'impiego della trascrittasi inversa.

Polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione

L'impiego degli enzimi di restrizione ha consentito di dimostrare che la stessa regione cromosomica può differire in diversi individui per la presenza o meno di alcuni siti di restrizione su cui agiscono queste endonucleasi. Anche nello stesso soggetto sono possibili differenze tra i due cromosomi omologhi e lo stato di eterozigosi caratterizzato dalla assenza o presenza di un particolare sito di restrizione può essere dimostrato mediante il Southern blotting. Nei soggetti eterozigoti, utilizzando la stessa sonda di DNA radiomarcata specifica per la regione di DNA che si intende esaminare, si dimostrerà la presenza di due bande di diversa lunghezza, anziché un'unica banda come avviene nei soggetti omozigoti. Con l'applicazione di questa tecnica allo studio genetico di famiglie in cui si sono manifestati più casi di una medesima malattia, è stato possibile mappare i geni di numerose malattie geneticamente determinate, tra le quali alcune immunodeficienze. Una volta avvenuta l'identificazione del gene coinvolto nella patogenesi di tali immunodeficienze, utilizzando lo studio del polimorfismo dei frammenti di restrizione è possibile, impiegando nel Southern blotting sonde appropriate, la diagnosi della malattia anche in fase prenatale (valutando ad esempio un campione prelevato dai villi coriali) o l'identificazione dei portatori asintomatici. In particolare, nell'ambito delle immunodeficienze primitive, la diagnosi prenatale o l'identificazione dei portatori mediante analisi del polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione è possibile discriminare fra le altre forme l'immunodeficienza Grave Combinata legata al cromosoma X, l'Agammaglobulinemia legata al sesso, la Sindrome di Wiskott-Aldrich, la Sindrome Iper-IgM, l'Atassia-telangiectasia, l'Ipoplasia delle cartilagini e del sistema pilifero, nonché la Malattia Granulomatosa Cronica legata al sesso.

Northern blotting

Il "Northern blotting" è una tecnica che consente di studiare l'acido nucleico trascritto, cioè l'RNA e di svelarne grossolane alterazioni. I principi di questa tecnica sono simili a quelli del Southern blotting. L'RNA denaturato viene sottoposto ad elettro-

foresi e successivamente trasferito su una membrana dove avviene l'ibridazione con una sonda specifica radiomarcata, capace di identificare un particolare mRNA. Con questa metodica si possono evidenziare situazioni nelle quali si verifica la formazione di mRNA di dimensioni anomale (che nella elettroforesi assumono posizioni diverse dai controlli), ma anche quelle situazioni nelle quali la mutazione genetica impedisce la trascrizione del DNA in mRNA. Anche questa metodica tuttavia non è in grado di svelare le mutazioni puntiformi che non modificano le dimensioni del trascritto, pur potendo provocare modificazioni che rendono non funzionale la proteina codificata.

Ibridazione in situ

L'ibridazione in situ è una tecnica che consente di localizzare a livello cellulare o cromosomico particolari sequenze di DNA (dopo denaturazione) o di RNA. Allo scopo si usano sonde di DNA o di RNA a singola elica radiomarcate o marcate con sostanze idonee alla rilevazione con tecniche di fluorescenza o con altri metodi di colorazione. Si potrà così rilevare sul campione in esame (ad esempio cellule fissate su vetrino) la presenza di sequenze di acidi nucleici complementari a quelle della sonda usata. In particolare nello studio funzionale del sistema immunitario la tecnica può essere impiegata per evidenziare alterazioni dei geni a livello del DNA o la presenza o meno nella cellula di mRNA relativo a particolari proteine (citochine, antigeni di membrana, ecc.).

Lyonizzazione (inattivazione del cromosoma X)

Con il termine "lyonizzazione", derivato dal cognome della ricercatrice M. Lyon che ha scoperto il fenomeno, si indica l'inattivazione funzionale dei geni presenti su uno dei due cromosomi X dei soggetti di sesso femminile. Questo meccanismo evita che, rispetto ai maschi, siano prodotte quantità eccessive delle proteine codificate dai geni presenti sul cromosoma X, di cui nelle femmine esistono due copie, e che sono assenti sul cromosoma Y. Generalmente il fenomeno avviene in maniera casuale e quindi in metà delle cellule femminili sarà inattivato il cromosoma X di origine materna e nell'altra metà quello di origine paterna. Quando su uno dei cromosomi X è presente un gene mutato si verifica una inattivazione preferenziale a carico appunto di tale cromosoma. Con l'impiego di tecniche molecolari che consentono di distinguere tra loro i due cromosomi, quello di origine materna e quello di origine paterna, è possibile documentare queste situazioni

in cui l'inattivazione del cromosoma X non avviene in maniera casuale ma preferenziale. Studiando le linee cellulari coinvolte nella immunodeficienza, con questa tecnica è possibile l'individuazione delle femmine portatrici di Agammaglobulinemia legata al sesso, di Immunodeficienza Grave Combinata legata al cromosoma X e di Sindrome di Wiskott-Aldrich.

Western blotting

Lo Western blotting è una tecnica di biologia molecolare utile per lo studio delle proprietà chimico-fisiche del prodotto proteico di un determinato gene. Questa indagine si affianca alle classiche tecniche immunologiche utilizzate per dimostrare la presenza di una proteina in un substrato mediante reazioni immunoenzimatiche o di immunofluorescenza con l'impiego di anticorpi specifici, opportunamente marcati. In questa tecnica le proteine vengono estratte e, dopo separazione mediante elettroforesi, sono trasferite su filtro. Successivamente è possibile l'identificazione della proteina, di cui la posizione elettroforetica indica il peso molecolare, mediante un anticorpo specifico marcato con un tracciante.

INDAGINI PER LA VALUTAZIONE FUNZIONALE DELLA RISPOSTA UMOREALE

Se le indagini di primo livello non hanno portato ad una esatta definizione diagnostica o hanno fornito risultati dubbi, per lo studio del sistema anticorpale è necessario ricorrere agli accertamenti di secondo livello (Tabella XXXVIII).

Si deve ricordare che nella quantizzazione delle classi Ig effettuata generalmente con immunodiffusione radiale, nefelometria o immunoelettroforesi ("tecnica rocket"), sono possibili risultati erronei legati a situazioni particolari. In alcuni pazienti con Deficit selettivo di IgA sono presenti in circolo anticorpi cross-reattivi con le proteine dei ruminanti che possono provocare artefatti se nella rilevazione sono utilizzati anticorpi di capra o di pecora. La immunodiffusione radiale può sottostimare la concentrazione di Ig in caso di mieloma o di macroglobulinemia di Waldenstrom. La presenza di fattore reumatoide può provocare una sottostima delle IgG alla immunodiffusione radiale e sovrastima in nefelometria. In alcune patologie quali l'Atassia-telangiectasia, la Sindrome Iper-IgM, il LES e l'Artrite reuma-

toide sono presenti in circolo IgM monomeriche e la concentrazione degli anticorpi di questa classe può risultare sovrastimata nell'immunodiffusione radiale a causa della diffusione più veloce del campione rispetto agli standard.

Come già ricordato, i livelli sierici di Ig rappresentano il risultato netto di sintesi, distribuzione, metabolismo e perdite di queste molecole da parte dell'organismo. Quando si sospetti che la riduzione di Ig consegua ad alterazioni metaboliche (eccessivo catabolismo) o perdite, può fornire indicazioni utili lo studio dell'emivita biologica delle Ig dopo reinfusione nel paziente di una certa quantità di Ig marcate con un tracciante (ad es. radiomarcate). Sono stati descritti casi di Distrofia miotonica in cui è presente un deficit anticorpale provocato da alterato catabolismo delle IgG.

Quando i livelli delle IgG totali risultano inferiori o prossimi ai limiti inferiori della norma, deve essere considerata la necessità di eseguire un dosaggio delle sottoclassi IgG; l'esame è anche indicato quando il dosaggio delle classi maggiori abbia documentato un deficit di IgA, data la frequenza con cui le due alterazioni si associano in quadri particolari di ID primitive del sistema anticorpale. Questa indagine viene generalmente effettuata mediante immunodiffusione radiale, più semplice e meno costosa, riservando il ricorso alle metodiche radioimmunologiche o immuno-enzimatiche (più precise, ma più costose) a quei casi in cui si voglia verificare se

Tab. XXXVIII. Principali indagini per la valutazione funzionale del sistema umorale

- Elettroforesi delle proteine sieriche (valutazione dei livelli di gamma-globuline in relazione all'età e in rapporto con quelli dell'albumina)
- Dosaggio delle classi maggiori di Ig (IgG, IgA, IgM) mediante immuno diffusione radiale o nefelometria, IgE mediante RIA o ELISA
- Dosaggio delle sottoclassi IgG
- Determinazione delle IgA nelle secrezioni
- Titolazione delle isoemoagglutinine sieriche (o delle eteroagglutinine)
- Valutazione della risposta anticorpale specifica (verso antigeni comuni o dopo immunizzazione attiva primaria o secondaria)
- Studio dell'emivita biologica delle immunoglobuline
- Valutazione del numero dei linfociti B circolanti
- Studio dell'espressione del MHC classe II sulla membrana delle cellule B
- Studio a livello midollare della presenza di cellule della linea B in diverse fasi maturative
- Valutazione funzionale in vitro dei linfociti B
- Proliferazione linfocitaria
- Produzione di anticorpi in vitro
- Indagini di biologia molecolare
- Altre indagini (studio delle aree B-linfocitarie su biopsie linfonodali o della mucosa intestinale)

ad un basso valore ottenuto all'immunodiffusione corrisponda un'assenza completa. Si deve ricordare che per il riconoscimento delle sottoclassi IgG, data la presenza di un'omologia superiore all'80%, è necessario far ricorso all'uso di anticorpi monoclonali e che l'immunodiffusione radiale può presentare dei limiti nei dosaggi delle sottoclassi di IgG meno rappresentate, cioè IgG3 ed IgG4. Un deficit di queste due sottoclassi può verificarsi in presenza di livelli di IgG totali perfettamente normali, proprio per la loro scarsa concentrazione relativa nell'ambito della classe, mentre nei deficit delle sottoclassi IgG1 (che da sola rappresenta oltre il 50% delle IgG sieriche) o di IgG2 è frequente il riscontro di una riduzione delle IgG totali. Qualora si rilevi l'assenza completa di una sottoclasse IgG, analogamente a quanto avviene per il deficit completo di una classe, la conferma che il deficit è conseguente alla delezione del gene corrispondente è fornita dallo studio mediante Southern blot presso una struttura adeguatamente specializzata. Con questo metodo si potrà documentare la delezione omozigote del gene per la catena pesante assente in circolo.

In alcuni casi può essere utile la determinazione delle Ig in fluidi corporei diversi dal siero, soprattutto le secrezioni. Tra queste viene studiata in particolare la saliva per la facilità di raccolta. La determinazione delle IgA nelle secrezioni costituisce uno strumento utile per lo studio di un importante meccanismo di difesa del sistema immunitario. Infatti le IgA presenti nelle secrezioni sono sintetizzate da plasmacellule presenti nella sottomucosa ed esplicano una funzione biologica primaria a livello delle mucose respiratorie, dell'apparato digerente e dell'apparato urogenitale. Sono infatti in grado di inattivare i patogeni prima che questi penetrino nell'organismo e riescono così a impedire infezioni locali e sistemiche. Si ritiene inoltre che l'azione delle IgA secretorie a livello dell'apparato digerente e respiratorio, anche per la loro struttura dimerica e la reattività bivalente, impedisca la penetrazione nell'organismo di antigeni alimentari e di sostanze aerotrasportate. In questo modo potrebbero inibire una risposta anticorpale mediata da altre classi, quali IgM, IgG e forse IgE nei confronti di tali antigeni. Questo potrebbe essere uno dei meccanismi per cui i soggetti con deficit di IgA avrebbero una maggiore facilità di sviluppare risposte IgE nei confronti di antigeni ambientali ubiquitari, come avviene nelle malattie atopiche. Per il dosaggio delle IgA salivari è preferibile l'impiego della immunoelettrodiffusione; tale tecnica risente meno dell'immunodiffusione radiale e della nefelometria delle interferenze

provocate dalla presenza di mucina nel campione. In alternativa, ma con costi maggiori, possono essere utilizzati metodi immunoenzimatici o radioimmunologici. Si deve ricordare che il dosaggio è mirato a stabilire la presenza o meno delle IgA nei secreti e non tanto finalizzato ad una precisa quantizzazione (infatti come standard si usano nei test IgA sieriche monomeriche, pur utilizzando dei fattori di correzione). Il test è utile per la diagnosi di Deficit selettivo di IgA e nella diagnosi differenziale tra forme transitorie e permanenti di ipogammaglobulinemia. Con alcune varianti il test consente il dosaggio delle sottoclassi IgA1 e IgA2, ma, al momento attuale la determinazione delle sottoclassi sui secreti è utile, in combinazione a quella eseguita sul siero, soltanto per la diagnosi di deficit di sottoclasse IgA da delezione dei geni per le catene pesanti.

In aggiunta alla titolazione delle isoelettroagglutinine sieriche (tra le indagini di primo livello), alcuni test relativamente semplici consentono una più precisa valutazione della risposta anticorpale antigene-specifica. A questo scopo possono essere utilizzati metodi capaci di rilevare anticorpi rivolti verso antigeni ai quali la popolazione è comunemente esposta od anticorpi prodotti in conseguenza di una immunizzazione attiva. Tra i primi si devono ricordare le antistreptolisine e gli anticorpi battericidi verso *Escherichia coli*. Per lo studio della risposta anticorpale dopo immunizzazione si possono titolare con metodi immunoenzimatici gli anticorpi verso le tossine difterica e tetanica o quelli antiperitossie. Per la valutazione in vivo della risposta verso la tossina difterica può essere utilizzato il test di Schick, che consiste nell'iniezione intradermica di una dose piccolissima di tossina difterica (1/50 di dose letale per la cavia). Gli individui che non hanno anticorpi sviluppano una reazione locale eritematosa (e talora necrotica per azione della tossina) mentre coloro che hanno anticorpi specifici neutralizzano la tossina ed i suoi effetti non si manifestano. Dato che dopo vaccinazione con tossoide tetanico si può sviluppare una risposta immunitaria cellulo-mediata che nei soggetti immunizzati può provocare a livello locale un quadro simile al test di Schick positivo, ma di significato opposto, nel test di Schick si usa come controllo l'iniezione nell'avambraccio controlaterale di una dose di tossoide tetanico analoga a quella di tossina utilizzata nel test. Qualora si debba studiare un soggetto non ancora immunizzato si può fare ricorso alla inoculazione dei normali vaccini previsti dalla legge, quali quelli per tetano, difterite o poliomielite (con virus ucciso - vaccino Salk). Si deve ricordare che quando si

sospetti un'immunodeficienza è obbligatorio escludere l'impiego di vaccini vivi (polio-Sabin, morbillo, rosolia, parotite, vaiolo) che possono provocare in questi pazienti infezioni generalizzate, talora molto gravi. Nei soggetti già immunizzati per tetano, difterite e pertosse, i livelli degli anticorpi specifici possono essere titolati dopo aver effettuato una iniezione di richiamo.

Sulla base dei suggerimenti dell'OMS, può essere studiata la risposta anticorpale dopo immunizzazione con il batteriofago FX174, che non infetta l'uomo ed è un antigene potente e sicuro, di cui può anche essere rilevata la "clearance" con tecniche appropriate. Per lo studio della risposta anticorpale nei confronti di antigeni composti da carboidrati, possono essere utilizzati per l'immunizzazione i polisaccaridi pneumococcico, meningococcico, quello di *Haemophilus* o l'antigene Vi della *Salmonella typhi*. Tale indagine è utile poiché sono stati descritti casi di individui con infezioni ricorrenti che presentavano un deficit di risposta anticorpale verso antigeni polisaccaridici, con normale risposta a quelli proteici. Il titolo anticorpale viene rilevato dopo due settimane dall'immunizzazione e può fornire utili informazioni sulla capacità del sistema immunitario di sviluppare una risposta anticorpale nei confronti di antigeni relativamente "timo-indipendenti". Si deve tuttavia ricordare che questi ed altri antigeni polisaccaridici non sono utili (perché tale tipo di risposta si sviluppa lentamente) e possono essere addirittura pericolosi nei bambini sotto i due anni, a meno che gli antigeni non siano coniugati a proteine (in questo caso tuttavia l'antigene diviene "timo-dipendente" e si modifica il significato del test). Inoltre l'interpretazione dei risultati nei bambini sotto i cinque anni può essere difficile. Altri antigeni utili per la misurazione della risposta anticorpale all'immunizzazione primaria sono, secondo le indicazioni dell'OMS, il virus ucciso dell'encefalite da zecche e il vaccino B dell'epatite.

La rilevazione della risposta anticorpale dopo immunizzazione primaria o secondaria è generalmente effettuata con metodi immunoenzimatici; per ogni antigene vengono forniti dal laboratorio degli standard di normalità per la valutazione della risposta. Generalmente si può considerare normale dopo 3 settimane dall'immunizzazione un aumento di almeno 4 volte dei livelli di anticorpi verso antigeni proteici e di 2 volte verso antigeni polisaccaridici.

Tra le indagini di secondo livello per la valutazione della risposta umorale sono inclusi i test per la valutazione del numero dei linfociti B circolanti. Tali accertamenti vengono generalmente effettuati

su un campione di sangue intero mediante citofluorimetria a flusso utilizzando anticorpi monoclonali rivolti verso marcatori specifici delle cellule della linea linfocitaria B (vedi capitolo 1.2). I marcatori più comunemente impiegati sono il CD19 (che compare precocemente durante la maturazione delle cellule B, allo stadio di linfociti pro-B e scompare al momento della differenziazione in plasmacellula), il CD20 (che compare più tardivamente del CD19, allo stadio di linfocita pre-B e viene perso anch'esso quando le cellule si differenziano in plasmacellule) o le Ig di membrana (IgM soprattutto); meno utilizzati sono il CD21 (CR2, recettore per il C3d ed EBV) ed il CD22. La valutazione numerica dei linfociti circolanti deve essere sempre effettuata sia in percentuale, che in valore assoluto. Tra le ID primitive, le cellule B sono praticamente assenti in circolo o fortemente diminuite nell'Agammaglobulinemia legata al sesso, nella Immunodeficienza associata a timoma, nella Disgenesia reticolare (in cui il deficit numerico dei linfociti B si accompagna a quello delle cellule di altre linee) ed in alcuni pazienti con Immunodeficienza comune variabile. In altri casi di Immunodeficienza comune variabile, nei Deficit di classe o sottoclasse Ig il numero dei linfociti B circolanti può risultare normale.

La citofluorimetria consente anche lo studio dell'espressione di molecole MHC di classe II sulla membrana delle cellule B; l'assenza di queste molecole dalla membrana dei linfociti B, dei monociti, delle "antigen presenting cells" e dei linfociti T attivati è caratteristica di una forma di ID combinata definita anche "Sindrome del linfocita nudo". In alcuni casi di questa malattia il deficit di molecole MHC di classe II si associa all'assenza delle molecole MHC di classe I.

In particolari patologie nelle quali le cellule B risultano assenti nel sangue periferico e negli organi linfoidi può essere effettuato lo studio su campioni biotici a livello midollare. Tale indagine consente anche di evidenziare lo stadio cui eventualmente si arresta la maturazione delle cellule della linea linfocitaria B; ciò è fattibile utilizzando l'analisi in combinazione di marcatori appropriati, come alcuni antigeni compresi nei CD linfocitari, le catene leggere e quelle pesanti μ delle Ig in membrana e nel citoplasma. Con questa tecnica si può documentare che nella Agammaglobulinemia legata al sesso l'arresto maturativo delle cellule della linea B avviene a livello di linfocita pro-B; tali elementi sono presenti a livello midollare in numero normale od aumentato, mentre sono assenti quelli in stadi maturativi più avanzati.

Con l'impiego combinato di marcatori diversi è attualmente possibile differenziare nell'ambito delle cellule B sottopopolazioni con caratteristiche maturative o funzionali particolari; dal punto di vista clinico tra queste sottopopolazioni ha notevole interesse la sottopopolazione dei linfociti B CD5⁺. Tali cellule sono caratterizzate dalla proprietà di produrre anticorpi rivolti verso autoantigeni e le cellule neoplastiche della Leucemia linfatica cronica appartengono a questa sottopopolazione.

Lo studio funzionale in vitro del sistema umorale si basa principalmente sulla valutazione della proliferazione e della differenziazione in senso anticorpopoietico delle cellule B dopo stimolazione con segnali di attivazione policlonale T-dipendente o T-indipendente. A tal fine sono utilizzati attivatori policlonali T-dipendenti, come la fitolacca americana ("pokeweed-mitogen" - PWM, che attiva sia i linfociti T che le cellule B) o T indipendenti, come il virus EBV, gli anticorpi rivolti verso le Ig di membrana dei linfociti B (anti-IgM), gli estratti di *Nocardia* o la proteina A stafilococcica insolubilizzata. Per l'attivazione delle cellule B purificate è anche possibile l'impiego di esteri del forbolo in associazione ai calcio-ionofori (queste sostanze esplicano intensa azione attivante anche sui linfociti T e ciò rende necessaria la preventiva purificazione della popolazione cellulare B in esame).

La proliferazione linfocitaria può essere rilevata mediante: 1) incorporazione di timidina triziata da parte delle cellule che si replicano quando entrano in fase S e successiva valutazione della radioattività incorporata con scintillatori ("beta-counter") dopo raccolta del DNA cellulare su appositi filtri e rilevazione con liquido di scintillazione; i risultati sono espressi come c.p.m. (conte per minuto) del campione stimolato rispetto a quello non stimolato, o come indice di stimolazione (c.p.m. delle colture stimulate/c.p.m. di quelle non stimulate); 2) incorporazione di nucleotidi fluorescenti nel DNA, rilevabili mediante citofluorimetria a flusso; 3) espressione all'interno o sulla membrana della cellula di marcatori, soprattutto enzimatici, coinvolti nella proliferazione linfocitaria evidenziabile anch'essa mediante citofluorimetria.

La produzione di anticorpi in vitro da parte delle cellule stimulate può essere analizzata: 1) con metodi di dosaggio radioimmunologico od immunoenzimatico idoneo a rilevare le piccole quantità di Ig delle diverse classi rilasciate nei sovranatanti delle colture cellulari dalle cellule B differenziate in plasmacellule in risposta allo stimolo; 2) con la quantizzazione mediante indagine in microscopia a fluorescenza o in citofluorimetria a flusso delle cellule anticorpopoie-

tiche che producono Ig delle diverse classi dimostrabili a livello del citoplasma cellulare (Ig intracitoplasmatiche); 3) conta delle cellule secernanti Ig delle diverse classi mediante tecniche immunoenzimatiche (tipo "ELISPOT"). L'impiego combinato di queste indagini nella valutazione della produzione anticorpale può consentire anche di differenziare alterazioni a carico delle diverse fasi della produzione anticorpale (sintesi e/o secrezione).

È necessario tuttavia ricordare che i test in vitro per lo studio funzionale del sistema anticorpale trovano all'atto pratico scarsa applicazione nella diagnostica clinica e sono prevalentemente impiegati a fini di ricerca. Nella valutazione delle ID l'unica utilizzazione clinica è generalmente rappresentata dalla definizione dell'alterazione immunologica nei casi di Immunodeficienza Comune Variabile, gruppo eterogeneo di patologie, caratterizzate da deficit di produzione anticorpale a manifestazione tardiva, nel cui ambito si comprendono forme nelle quali l'alterazione è intrinseca alle cellule B e forme in cui l'immunodeficit è conseguenza di un'alterazione T (deficit di "help" o disfunzioni di natura diversa).

Proprio per il fatto che un deficit di produzione anticorpale può conseguire ad un'alterazione della funzione regolatoria delle cellule T, in determinate situazioni è necessario completare le indagini per la valutazione del sistema umorale con uno studio funzionale dei linfociti T mediante opportune metodiche (vedi oltre, "studio dell'attività helper delle cellule T").

In alcune forme di immunodeficienza del sistema anticorpale, isolato o combinato, la precisa definizione diagnostica è oggi possibile con l'impiego di tecniche di biologia molecolare. Esempi in tal senso sono costituiti dall'Agammaglobulinemia legata al sesso (s. di Bruton) provocata dall'alterazione del gene *btk* (che codifica per una tirosino-chinasi) sul cromosoma X e dalla Sindrome iper-IgM, documentabili mediante analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione.

Tra le altre indagini utili per il completamento dell'esame funzionale del sistema di risposta anticorpale devono essere ricordate le indagini microscopiche con appropriati marcatori per la valutazione delle aree "B-dipendenti" a livello linfonodale o dei centri germinativi su biopsie dell'apparato digerente; a questo livello può essere anche rilevata mediante immunofluorescenza la presenza della componente secretoria delle IgA, prodotta dalle cellule epiteliali, che può consentire di diagnosticare un deficit di IgA nei secreti conseguente a carenza di questo fattore.

INDAGINI PER LA VALUTAZIONE FUNZIONALE DELL'IMMUNITÀ CELLULARE

Fra i test di secondo livello per la valutazione funzionale dell'immunità cellulare (Tabella XXXIX) vanno ricordati in primo luogo quelli che consentono di valutare quantitativamente le cellule T e NK circolanti. La rilevazione del numero delle cellule di queste popolazioni nel sangue periferico rappresenta una delle indagini funzionali per lo studio del sistema immunitario utilizzate da più tempo. Dalla fine degli anni '60 si era dimostrato che nell'ambito dei linfociti una popolazione cellulare, che in condizioni di normalità rappresentava la maggioranza, era in grado di fornire "rosette E" legando le emazie di montone attraverso specifici recettori di membrana. Tale popolazione è stata lungamente identificata con i linfociti T; successivamente i progressi delle conoscenze sugli antigeni di membrana e la loro precisa caratterizzazione e inclusione in CD ("cluster of differentiation") di cui è definita con certezza la espressione su differenti linee cellulari ha dimostrato che la molecola responsabile del legame con gli eritrociti di montone, l'antigene CD2, è espresso sia dai linfociti T che dalle cellule NK.

Per la valutazione numerica dei linfociti T e delle cellule NK attualmente sono utilizzati marcatori che sono veramente specifici per queste diverse linee cellulari, rilevabili con l'impiego di anticorpi monoclonali che li riconoscono in tecniche di citofluorimetria o di microscopia a fluorescenza. Per la individuazione dei linfociti T si utilizzano principalmente anticorpi monoclonali anti-CD3, struttura molecolare associata al recettore per l'antigene di queste cellule. Le cellule NK sono invece caratterizzabili per l'espressione sulla loro membrana di CD16 (FcγRIII, recettore a bassa affinità per il frammento Fc delle IgG, espresso anche da polimorfonucleati e monociti), di CD56 (NKH1, espresso anche da alcuni linfociti attivati) o di CD57 (antigene HNK1, che individua una sottopopolazione maggioritaria di cellule NK).

L'impiego di opportuni marcatori consente inoltre la valutazione quantitativa di cellule T che appartengono a sottopopolazioni diverse. Tra queste la rilevanza clinica maggiore spetta alle sottopopolazioni T linfocitarie CD4 e CD8. I marcatori CD4 e CD8 definiscono linfociti T che riconoscono l'antigene presentato con modalità differenti (in associazione con molecole MHC di classe II i CD4, con molecole MHC di classe I i CD8) e svolgono funzioni effettrici diverse (sono infatti definiti, forse semplicistica-

Tab. XXXIX. Principali indagini per la valutazione funzionale dell'immunità cellulo-mediata

- Esame emocronocitometrico con formula leucocitaria (conta dei valori assoluti dei linfociti)
- Test cutanei di ipersensibilità ritardata verso "antigeni di richiamo"
- Valutazione quantitativa dei linfociti T e delle cellule NK nel sangue periferico
- Valutazione quantitativa delle sottopopolazioni T linfocitarie nel sangue periferico
- Valutazione funzionale in vitro dei linfociti T dopo stimolazione con antigeni, attivatori polyclonali o in coltura mista linfocitaria
- Espressione di marcatori di attivazione o di molecole di costimolazione
- Proliferazione linfocitaria in vitro
- Produzione di citochine in vitro
- Attività "helper" in vitro
- Attività citotossica T (CTL) in vitro
- Valutazione dell'attività citotossica delle cellule NK

Altre indagini

- dosaggi enzimatici
- dosaggio dell'α-fetoproteina

mente, "helper" i TCD4 e "citotossici" i TCD8). Le molecole CD4 e CD8 sono generalmente espresse sulle cellule del sangue periferico in maniera mutualmente esclusiva; la presenza in circolo di proporzioni importanti di cellule che coesprimono tali marcatori può suggerire il passaggio anomalo in periferia di linfociti T immaturi, che durante la maturazione intratimica coesprimono le due molecole. La principale applicazione clinica di questo tipo di indagine è senz'altro rappresentata dal monitoraggio dei pazienti con infezione da HIV, nei quali il patogeno provoca una graduale e progressiva riduzione dei linfociti T CD4 circolanti. Tale deplezione può essere dimostrata valutando sia il rapporto tra linfociti T CD4/CD8, normalmente compreso tra 1 e 2, sia, con maggior precisione determinando in valore assoluto il numero dei linfociti TCD4 circolanti (Figura 38). Oltre che nella diagnostica dell'infezione da HIV, questa indagine è fondamentale per la diagnosi di alcune forme di ID primitiva: la Immunodeficienza combinata da deficit di CD8 e il Deficit primitivo di CD4. Non si deve inoltre dimenticare che varie alterazioni numeriche delle popolazioni CD4 e CD8 sono state descritte in numerose immunodeficienze secondarie che si associano a patologie infettive, neoplastiche o autoimmuni.

L'impiego di altri marcatori consente di distinguere nell'ambito dei linfociti T circolanti alcune sottopopolazioni. In particolare si possono differenziare linfociti T dotati di recettore per l'antigene TCR2, costituito dalle catene α/β, che rappresentano la larga maggioranza dei T circolanti, dai linfociti T dotati di recettore per l'antigene TCR1, costi-

tuito dalle molecole $\gamma\delta$, che non esprimono CD4 o CD8 e, seppur minoritari in circolo, sono diffusamente presenti a livello delle mucose ove forse svolgono un importante ruolo difensivo. Tuttavia non sono state fino ad oggi descritte con certezza alterazioni numeriche di queste sottopopolazioni nelle immunodeficienze primitive o secondarie.

Un altro esempio è fornito dai marcatori che consentono la definizione di sottopopolazioni T linfocitarie in base all'espressione dagli antigeni CD45RA e CD45RO; la molecola CD45RO è espressa dai linfociti T (sia CD4 che CD8) "della memoria", che hanno quindi già incontrato l'antigene, mentre CD45RA è espresso dai linfociti T vergini.

È stato dimostrato che nell'ambito dei linfociti T sia CD4 che CD8 può essere operata un'ulteriore suddivisione su base funzionale, con riferimento principalmente alla capacità di discernere particolari citochine ed alle modalità verso cui da esse viene orientata la risposta immunitaria. Sono state individuate popolazioni linfocitarie T polarizzate definite linfociti Th1 (T "helper" 1) o Tc1 (T "cytotoxic" 1) e linfociti Th2 e Tc2 (vedi "La risposta immune adotti-

va"). Alcuni marcatori sono utili per il riconoscimento di tali sottopopolazioni nel sangue periferico, negli organi linfoidi o negli infiltrati infiammatori. Dopo attivazione in vitro od in vivo i linfociti Th1 e Tc1 esprimono preferenzialmente LAG3, CD26, IFN- γ di membrana ed il recettore per le chemochine CCR5, mentre i Th2 e Tc2 esprimono preferenzialmente CD30, la L-selectina CD62L ed i recettori chemochinici CCR4 e CCR8. Lo studio di questi marcatori nelle ID ha già iniziato a trovare qualche applicazione. È stato infatti dimostrato che nella S. di Omenn, una forma di ID grave nella quale alcune manifestazioni cliniche richiamano la GvHD e in cui sono presenti ipercosinofilia ed elevati livelli di IgE, i linfociti T, che in buona parte mostrano attività Th2, esprimono preferenzialmente CD30 e nel siero sono presenti elevati livelli di CD30 solubile.

La fase successiva dello studio dei linfociti T è rappresentata dall'analisi in vitro dell'attività funzionale di queste cellule, che viene analizzata dopo la loro attivazione. Tali indagini sono importanti oltre che nella valutazione dell'immunità cellulomediata, per la diagnostica di quei casi in cui un

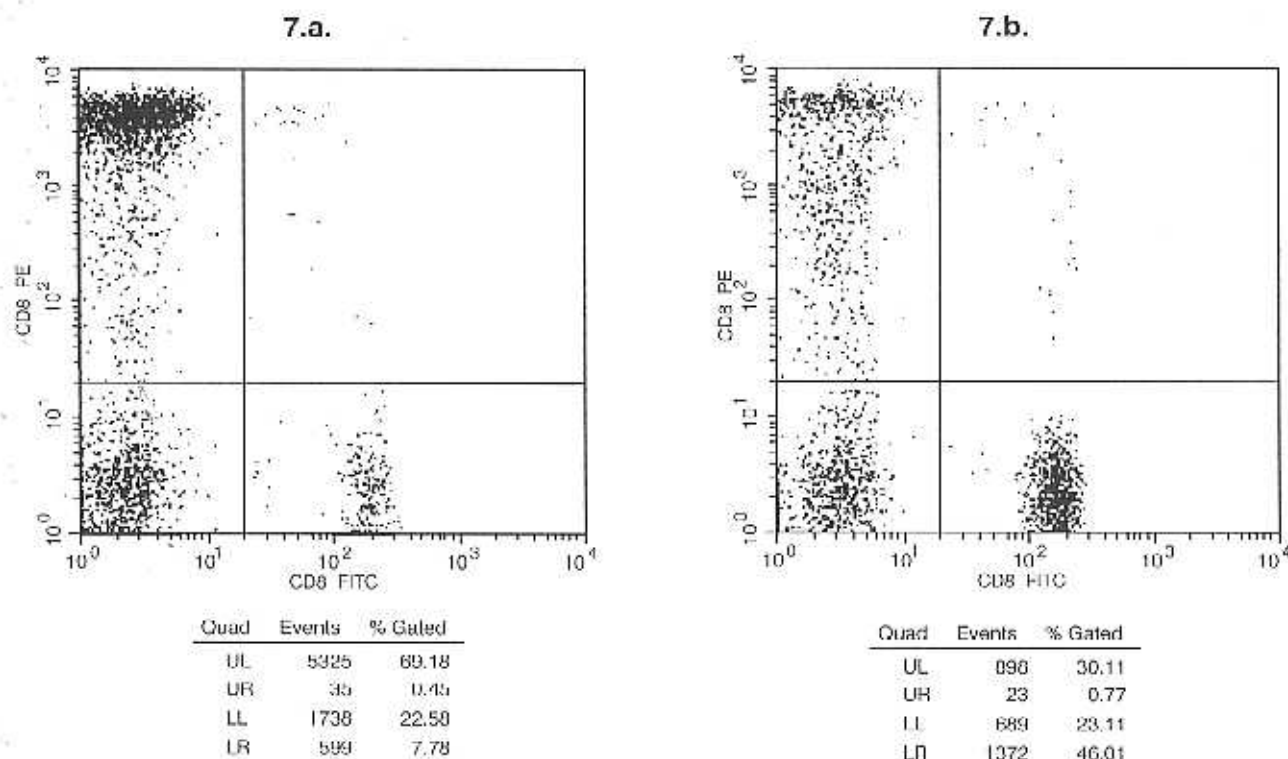


Fig. 38: Determinazione su un singolo campione delle cellule che esprimono i marcatori CD4 (FITC) e CD8 (PE). Nel grafico (a) relativo all'esame sul sangue periferico di un paziente con infezione da HIV, si può rilevare una notevole sproporzione tra le due sottopopolazioni, conseguente ad una deplezione delle cellule CD4⁺ rispetto a quanto si può rilevare sul grafico di un soggetto normale (b). L'analisi elettronica dei dati consente di ottenere i valori assoluti dei linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ circolanti, parametro indispensabile per definire l'alterazione immunologica e "quantizzare" l'immunodeficit conseguente all'infezione da HIV.

deficit di risposta anticorpale non consegue ad un'alterazione intrinseca alle cellule B, ma è provocata da alterazioni della funzione "helper" o di quella regolatoria da parte dei linfociti T.

Per l'attivazione in vitro dei linfociti T sono disponibili stimoli diversi: a) attivatori policlonali come i mitogeni (tra cui la fitoemoagglutina - PHA -, la concanavalina A - ConA, la fitolacca americana - "pokeweed mitogen" PWM, o l'uso combinato di esteri del forbolo più ionofori del calcio); b) i "superantigeni" che attivano numerosi cloni di cellule T mediante interazione aspecifica con alcune porzioni V del TCR sui linfociti T e la parte non polimorfica delle molecole MHC di classe II sulle APC; c) anticorpi rivolti verso molecole di membrana dei linfociti T (quali CD3, CD2, CD28, CD43) coinvolte nella trasduzione del segnale; d) cellule allogeniche; e) antigeni di richiamo (PPD, candidina, streptochinasi, tossoide tetanico e difterico). Nell'ambito degli attivatori linfocitari si possono distinguere segnali che attivano la cellula tramite il complesso recettoriale TCR/CD3 (antigeni, alloantigeni, superantigeni, mitogeni e anticorpi anti-CD3 insolubilizzati) ed attivatori che agiscono "a valle" del recettore o attraverso vie alternative (combinazione di esteri del forbolo e calcio-ionofori, anticorpi anti-CD2). Con l'uso combinato di questi attivatori è possibile diagnosticare alcune forme di immunodeficienza Grave Combinata da alterazione dei meccanismi di trasduzione, in cui si hanno risposte scarse o assenti agli stimoli che agiscono mediante il CD3, mentre appare normale quella agli stimoli indipendenti da questa via. Lo studio della risposta ad alloantigeni si effettua nelle "colture miste linfocitarie" ("mixed leukocyte culture" - MLC) in cui i linfociti T in esame ("responder") sono stimolati a proliferare dalle molecole MHC espresse da leucociti allogenici ("stimulator") trattati in modo da bloccare la risposta proliferativa (irradiati o trattati con mitomicina). Nelle MLC dei soggetti normali l'entità della proliferazione è inversamente proporzionale alla istocompatibilità tra "responder" e "stimulator" e la tecnica è fondamentale nella scelta di donatori di trapianto, soprattutto di midollo osseo.

Le tecniche di laboratorio consentono di valutare i diversi fenomeni attraverso i quali si estrinseca l'attivazione delle cellule T: a) espressione di marcatori di attivazione e di molecole coinvolte nella costimolazione; b) proliferazione linfocitaria; c) produzione di citochine; d) capacità di svolgere azione "helper" sulla produzione anticorpale, e) funzione citotossica.

Dopo l'applicazione dello stimolo i linfociti T responsivi al segnale esprimono in membrana mar-

catori di attivazione quali CD25 (catena α del recettore per IL2), CD69, CD71 (recettore per la transferrina) o le molecole MHC di classe II (DR soprattutto). L'espressione di tali molecole può essere facilmente analizzata mediante citometria a flusso che consente di valutare la risposta delle cellule T nelle prime fasi dopo l'attivazione da parte di stimoli policlonali od antigene-specifici. La citofluorimetria consente anche di valutare la capacità dei linfociti T stimolati di esprimere molecole coinvolte nella costimolazione delle cellule B. Tra queste molecole particolarmente importante è CD154 (o CD401). È stato infatti dimostrato che un'alterazione del gene posto sul cromosoma X che codifica questa molecola è alla base della Sindrome da Iper-IgM. Anche in un gruppo di pazienti con Immunodeficienza Comune Variabile è stata documentata l'incapacità dei linfociti T attivati di esprimere in membrana CD401.

La proliferazione linfocitaria può essere analizzata con i metodi già ricordati per lo studio della funzionalità dei linfociti B: 1) incorporazione di timidina triziata da parte delle cellule che si replicano e successiva valutazione della radioattività incorporata con scintillatori ("beta-counter"); 2) incorporazione di nucleotidi fluoresceinati nel DNA, rilevabili mediante citofluorimetria a flusso; 3) espressione di marcatori, soprattutto enzimatici, coinvolti nella proliferazione linfocitaria, evidenziabili mediante citofluorimetria.

La produzione di citochine (soprattutto IL-2, IL-4, IL-5, ed IFN- γ) da parte dei linfociti T in risposta all'attivazione da parte degli stimoli ricordati in precedenza può essere rilevata utilizzando test immunoenzimatici specifici che consentono di quantizzare le citochine presenti nel sovranatante delle colture cellulari. In alternativa, lo studio della secrezione di alcune citochine è possibile attraverso test biologici; esistono alcune linee cellulari che proliferano in maniera proporzionale alla presenza di una particolare citochina nel terreno di coltura, (ad es. la linea CTLL2 la cui proliferazione è IL-2 dipendente). In questo sistema si può determinare semiquantitativamente la presenza di una citochina in un sovrinatante confrontando la proliferazione della linea in presenza di sovrinatante con quella ottenuta in presenza della citochina ricombinante o purificata, a differenti concentrazioni. La capacità di sintetizzare una citochina è anche documentabile mediante la dimostrazione della sua presenza nel citoplasma delle cellule attivate; questo è possibile su cellule in sospensione con la citofluorimetria utilizzando anticorpi specifici verso le diverse citochine.

ed aggiungendo al sistema sostanze che inibiscono la secrezione al di fuori delle cellule delle proteine prodotte. Per lo studio di sezioni di campioni istologici si possono usare metodi immunoenzimatici. Anche con tecniche di biologia molecolare, quali la ibridazione in situ o la PCR, è possibile documentare la capacità delle cellule di esprimere mRNA delle diverse citochine; si deve tuttavia tenere presente che l'espressione di mRNA può non implicare automaticamente la sintesi della molecola.

Le citochine svolgono un ruolo fondamentale nella reazione immunitaria. Il difetto di produzione di una o più citochine provoca rilevanti alterazioni del sistema immunitario. Nella classificazione delle immunodeficienze primitive dell'OMS sono incluse due forme di Immunodeficienza Grave Combinata di recente individuazione caratterizzate da alterazioni nella produzione di citochine: a) il Deficit di IL-2, in cui il gene della citochina non viene trascritto e b) il Deficit di molteplici citochine (o Deficit di NF-AT), in cui sono carenti IL-2, IL-4, IL-5 ed IFN- γ per un'alterazione a carico del fattore nucleare delle cellule T attivate (NF-AT) che ne regola la trascrizione genetica. La diagnosi di queste forme è possibile mediante lo studio della produzione di citochine.

L'allestimento di particolari colture cellulari, definite co-colture, consente di valutare l'attività "helper" dei linfociti T sulla produzione anticorpale. Questo tipo di indagini pertanto può essere considerato anche come strumento di studio del sistema anticorpale. La metodica è stata messa a punto per stabilire se il deficit di produzione di anticorpi sia imputabile ad alterazioni intrinseche alle cellule B o ad un'alterata funzione T. Il test valuta la produzione di anticorpi in colture stimulate con PWM nelle quali, i linfociti B e T purificati del paziente sono ricombinati tra loro o con linfociti T e B di un soggetto normale. Se nel soggetto in esame è presente un difetto intrinseco dei linfociti B non si avrà produzione anticorpale nemmeno nelle co-colture con linfociti T di controllo, mentre i suoi linfociti T svolgeranno normale attività "helper" sui linfociti B del controllo. In caso di un deficit funzionale dei linfociti T, i linfociti B del soggetto in esame produrranno normalmente anticorpi quando sono co-cultivati con linfociti T normali, mentre i linfociti B normali non produrranno Ig nelle co-colture con i T del soggetto.

L'attività citotossica costituisce uno degli elementi principali dell'azione effettrice dei linfociti T ed è importante nella difesa dell'organismo verso infezioni virali o neoplasie; è inoltre coinvolta nelle reazioni nei confronti di cellule allogeniche (rigetto

del trapianto, GVHD). Per lo studio della citotossicità T si valuta la capacità di queste cellule attivate di uccidere cellule bersaglio (costituite da cellule allogeniche o da cellule autologhe infettate con virus) nei confronti delle quali siano state in precedenza sensibilizzate mediante coltura mista o mediante attivatori policlonali (lectine come la PHA, "lectin dependent cell-mediated cytotoxicity" - LDCC). La capacità citotossica delle cellule T può venir quantizzata misurando la percentuale di liberazione di radio-cromo precedentemente incorporato dalle cellule bersaglio rilevando la radioattività, o con tecniche citofluorimetriche facendo incorporare alle cellule bersaglio un fluorocromo e quantizzando la variazione di fluorescenza.

L'attività citotossica delle cellule NK può essere rilevata con tecniche simili in cui si utilizzano come cellule bersaglio linee tumorali come l'eritroleucemia K562 radiomarcata. In questo test si sfrutta la capacità delle cellule NK non stimulate di lisare alcuni bersagli rappresentati da cellule tumorali particolari. In presenza di elevate concentrazioni di IL-2 le cellule NK divengono capaci di uccidere cellule tumorali, non solo di linee particolari come la K562, ma anche di linee diverse o cellule tumorali fresche normalmente resistenti all'attività NK; tale attività è definita "LAK" ("lymphokine-activated killer").

Le cellule NK sono anche in grado di svolgere "citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente" (ADCC), mediante reazione del CD16 sulla loro membrana con il frammento Fc di IgG legate a cellule bersaglio ed attivazione dei meccanismi citolitici. Per lo studio di questa funzione si impiegano come cellule bersaglio linee cellulari NK-resistenti precedentemente sensibilizzate con anticorpi IgG specifici. Si deve ricordare che anche cellule che esprimono CD16 in membrana diverse dalle NK, monociti soprattutto, possono svolgere ADCC. Tra le ID primitive l'attività funzionale delle cellule NK risulta fortemente compromessa nella sindrome di Chediak-Higashi; alterazioni funzionali sono anche state descritte in soggetti con infezioni erpetiche ricorrenti.

In alcune situazioni la valutazione dell'immunità cellulo-mediata può essere completata con l'esecuzione di altre indagini, non strettamente immunologiche. Tra queste menzione particolare meritano i dosaggi enzimatici dell'adenosin-deaminasi (ADA) e della purin-nucleoside-fosforilasi (PNP). La carenza di tali enzimi su base genetica provoca due forme primitive di Immunodeficienza Grave Combinata. Poiché gli enzimi, oltre che nei linfociti, sono presenti in cellule di altre linee tra cui gli eritrociti,

il dosaggio dell'attività enzimatica viene di regola effettuato con metodi biochimici sul lisato eritrocitario valutando la capacità di deaminare l'adenosina (per l'ADA) o defosforilare l'inosina (per la PNP). L'esecuzione del test su eritrociti del cordone ombelicale o su cellule del liquido amniotico consente anche la diagnosi prenatale di queste ID. La conferma della presenza di un difetto genetico a trasmissione ereditaria può essere ottenuta valutando l'attività enzimatica sugli eritrociti dei genitori, che in caso di eterozigosi per l'alterazione risulta pari al 50% del normale. Nei soggetti con deficit di PNP si può anche rilevare un'aumentata escrezione di deossiguanosina (GPT) con le urine.

La valutazione dei livelli sierici di α -fetoproteina (dopo il primo anno di vita in cui i livelli sono fisiologicamente elevati) è un'indagine semplice che consente la diagnosi di Atassia-teleangectasia; infatti livelli di α -fetoproteina superiori a 20 ng/ml sono praticamente patognomonici di questa grave ID primitiva.

INDAGINI PER LA VALUTAZIONE FUNZIONALE DEL SISTEMA FAGOCITARIO

Le indagini di primo livello per lo studio funzionale del sistema fagocitario, già menzionate, consistono nella valutazione numerica di granulociti e monociti all'esame emocromocitometrico con formula e nella valutazione morfologica di queste cellule al microscopio su striscio di sangue periferico. Quando non siano emerse alterazioni numeriche o morfologiche, l'ulteriore approfondimento diagnostico si fonda sullo studio delle capacità di adesione, di motilità, di chemiotassi, di fagocitosi e "killing" intracellulare di queste cellule (Tabella XL). Un gruppo di immunodeficienze primitive del sistema fagocitario su base genetica è provocato da difetti nella capacità di queste cellule di aderire. Si distinguono due forme: "Leukocyte adhesion defect" (LAD)-1 provocato dalla mancata espressione sulla membrana di CD18, e LAD-2 provocato dalla mancata espressione di sialil-Lewis X. La diagnostica di queste forme si fonda sull'analisi in citofluorimetria a flusso delle cellule, soprattutto neutrofili, dopo colorazione con appropriati anticorpi monoclonali. Il CD18 costituisce la catena $\beta 2$ di tre diverse molecole di adesione eterodimeriche della membrana leucocitaria (integrine LFA-1, CR3 o MAC-1 e p150, 95), nelle quali è associato con una specifica catena α (rispettivamente CD11a, CD11b e CD11c). Nella LAD-1 anticorpi monoclonali anti-CD18 od anti-CD11

consentono di documentare l'assenza di queste integrine sulla superficie cellulare (nei portatori eterozigoti si dimostra una ridotta espressione). Nella LAD2 la mancata espressione di sialil-Lewis X, ligando naturale delle selectine E e P, è dimostrabile con anticorpi specifici per questo antigene come l'anticorpo monoclonale CSLEX1.

Lo studio degli altri elementi della funzionalità fagocitaria si basa in gran parte su test più complessi, che possono essere effettuati in strutture specializzate. La mobilità cellulare e la chemiotassi possono essere valutate in vivo mediante camera di Reubuck. In questo test su un'area di cute abrasa si pone un vetrino coprioggetto sostituendolo ogni 30 minuti per 24 ore. La conta e l'analisi morfologica dei leucociti adesi ai vetrini fissati e colorati consente di valutare le cellule che sono migrate nella zona abrasa. Questo esame trova oggi un uso limitato perché lungo e macchinoso. La mobilità spontanea leucocitaria in vitro e quella indotta da stimoli chemiotattici possono essere misurate con l'impiego della camera di Boyden, una camera a due scomparti separati da una membrana da filtro (millipore): in uno scompartimento si pone la sospensione cellulare in esame, mentre nell'altra si può porre lo stimolo chemiotattico (ad es. C5a ottenuto dal siero fresco con stimoli che attivano il complemento per la via alternativa come zimosan, endotossine, immunocomplessi oppure N-formil-metionil-leucil-fenilalanina -fMLP). Dopo un certo tempo (60-90') il filtro viene rimosso, fissato e colorato. Vengono contate le cellule leucocitarie che hanno migrato nei pori del filtro e viene misurato lo

Tab. XL. Principali indagini per la valutazione funzionale del sistema fagocitario (A) e del complemento (B)

A)	
-	Esame emocromocitometrico con formula leucocitaria (valori assoluti di neutrofili e monociti)
-	Analisi morfologica delle cellule fagocitarie (soprattutto neutrofili) all'esame microscopico dello striscio di sangue periferico
-	Studio mediante immunofluorescenza dell'espressione di molecole recettoriali sulla membrana leucocitaria
-	Studio della mobilità e chemiotassi in vivo e in vitro
-	Studio della fagocitosi e dell'attivazione metabolica
-	Test di "killing" di batteri o miceti
-	Test biochimici
-	Indagini di biologia molecolare
B)	
-	Attività emolitica del siero (CH50)
-	Dosaggio quantitativo delle singole componenti del complemento
-	Dosaggio funzionale delle singole componenti del complemento

spazio che hanno percorso in risposta allo stimolo confrontando il dato con un controllo non stimolato. Un metodo alternativo per valutare in vitro la migrazione in risposta ad uno stimolo chemiotattico utilizza uno strato di gel di agarosio con più pozzetti: in uno si pongono le cellule, negli altri lo stimolo chemiotattico od il controllo. Dopo un tempo appropriato si valuta la diffusione delle cellule verso lo stimolo. Anche se studi di questo tipo consentono di documentare alterazioni delle chemiotassi in importanti ID primitive come la sindrome di Chediak-Higashi o vengono utilizzati per valutare l'effetto di sostanze farmacologiche, questi test presentano limiti di riproducibilità e sono condizionati dal fatto che anche in soggetti normali i risultati possono essere alterati in corso di infezioni anche banali.

La capacità dei leucociti di fagocitare particelle estranee e di attivare alcuni meccanismi biochimici dopo fagocitosi può essere rilevata con alcuni test in vitro. I test di ingestione si eseguono esponendo i leucociti a miceti opsonizzati (*Candida albicans* o altri lieviti) od a particelle di latex. Dopo un certo intervallo dall'esposizione, le cellule vengono raccolte su vetrino, colorate; vengono contate le cellule che hanno fagocitato ed il numero di particelle fagocitate. Questi parametri sono un indice dell'efficienza della fagocitosi. Nello stesso test l'uso leucociti normali consente la valutazione della capacità opsonizzante del siero.

In conseguenza della fagocitosi la cellula attiva particolari meccanismi biochimici finalizzati all'uccisione del patogeno; tra questi il principale è il "respiratory burst" che porta alla formazione di radicali superossido, radicali idrossilici, perossido di idrogeno ed ioni ossigeno.

Una valutazione globale del metabolismo leucocitario è possibile facendo avvenire la fagocitosi in presenza di glucosio radiomarcato e misurando la quantità di CO₂ radiomarcata prodotta. La funzionalità della nicotin-amide dinucleotide-fosfato-ridotto (NADPH) ossidasi attivata in conseguenza della fagocitosi può essere valutata mediante misurazione del consumo di O₂ (con elettrodo di Clark) o rilevazione in chemiluminescenza o mediante spettrofotometro dei prodotti reattivi dell'ossigeno formati. In alternativa, un'indagine relativamente semplice che può essere utilizzata allo stesso scopo è il test del nitroblu di tetrazolio (NBT). Il test si basa sul fatto che il NBT, composto incolore, in presenza dei derivati dell'ossigeno prodotti dalla NADPH ossidasi viene ridotto a formazano, sostanza di colore blu. Esistono diverse varianti del test: una quantitativa in cui NBT è aggiunto ad un sistema formato da leucociti attivati da

particelle opsonizzate od esteri del forbulo e calcio-ionofori; la quantità di NBT ridotto è rilevata mediante spettrofotometria a 515 nm. Nell'altra variante (qualitativa) le cellule attivate con gli stessi sistemi in presenza di NBT sono citocentrifugate e le cellule che contengono nel citoplasma granuli blu sono valutate percentualmente. Il test con NBT, che classicamente risulta negativo nella Malattia Granulomatosa Cronica, consente anche di identificare le portatrici in cui si ha in circolo la presenza di un 50% di fagociti normali ed un 50% di fagociti alterati. Attualmente il test con NBT è considerato dall'OMS l'indagine standard per la rilevazione della funzionalità della "oxidative burst".

Un metodo alternativo per la valutazione della "oxidative burst" può essere effettuato mediante citofluorimetria utilizzando coloranti intracellulari (2',7'-diclorofluoresceina diacetato o 123 diidrorodamina) che divengono fluorescenti dopo esposizione ai prodotti reattivi dell'ossigeno. Questo test ha il vantaggio della relativa semplicità e di essere quantitativo.

Per valutare la capacità dei neutrofili di esplicare "killing" di batteri e miceti sono possibili test in vitro relativamente semplici. Per lo studio del killing batterico la sospensione leucocitaria viene incubata per un certo periodo di tempo con un numero noto di batteri (*Stafilococco aureo*, *Streptococco fecale*, *E. coli*) opsonizzati; dopo l'incubazione si può quantizzare in coltura il numero di batteri sopravvissuti nel sovrantante libero di cellule ed i risultati sono confrontati con quelli di un controllo normale. In aggiunta, per ottenere informazioni sulla capacità litica intracellulare dei leucociti sui batteri fagocitati, si può valutare la crescita in coltura dei batteri presenti nel materiale ottenuto dal lisato cellulare.

Per la valutazione dell'attività di "killing" di miceti (*Candida*, *Aspergillo*) sono possibili test più semplici. Dopo incubazione dei leucociti con i miceti opsonizzati la quantità di miceti (*Candida*) uccisi può essere valutata aggiungendo blu di metilene che colora soltanto gli elementi morti, o mediante la semplice analisi morfologica che consente di distinguere i conidi morti dalle forme vitali dell'*Aspergillo*. La rilevazione dei difetti di glucosio-6-fosfato deidrogenasi e di mieloperossidasi nei neutrofili è possibile attraverso dosaggi dell'attività enzimatica sull'estratto cellulare o mediante colorazione degli enzimi all'interno delle cellule.

Con l'identificazione dei geni responsabili, sono divenute possibili negli ultimi anni per la diagnosi di Malattia Granulomatosa Cronica indagini di biologia molecolare come l'analisi del polimorfismo

di lunghezza dei frammenti di restrizione; questi test sono particolarmente utili nella diagnostica prenatale e nell'individuazione dei portatori.

INDAGINI PER LA VALUTAZIONE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Il test di base per lo studio del sistema complementare è il test CH50, che è già stato trattato tra le indagini di primo livello per lo studio del sistema immunitario. Qualora i risultati di questo test risultino alterati, la definizione del fattore carente è possibile mediante test funzionali o quantitativi. Tali indagini, oltre che per lo studio di immunodeficit specifici del complemento, trovano una larga applicazione clinica per lo studio di patologie nelle quali si verifica un consumo del complemento, come alcune malattie autoimmuni. In tal senso vengono generalmente dosati tra i componenti del complemento C3 e C4. Oltre ad una determinazione relativamente semplice, dal loro confronto si può differenziare un consumo conseguente ad attivazione per la via classica o per la via alternativa (riduzione di C3 e normalità di C4).

La determinazione funzionale dei singoli fattori si basa sul test emolitico nel quale al siero in esame vengono aggiunti i diversi fattori purificati fino ad individuare quello che è in grado di ripristinare l'azione litica. Per controllo si possono usare sieri nei quali sia stata dimostrata la carenza di particolari fattori. Il dosaggio quantitativo della concentrazione nel siero dei singoli fattori è possibile con metodi immunologici (immunodiffusione radiale, immunoelettrodiffusione, ecc.) utilizzando opportuni anticorpi. In alcune situazioni può essere utile affiancare i test funzionali ai test quantitativi, perché sono state descritte situazioni di deficit nelle quali sono presenti quantità normali di un determinato fattore, ma esso risulta funzionalmente inattivo in conseguenza di alterazioni qualitative o per presenza di autoanticorpi. Una situazione di questo tipo

può essere alla base delle manifestazioni di edema angioneurotico conseguente a deficit di inibitore di C1-esterasi. Esistono forme ereditarie nelle quali il fattore non viene sintetizzato a causa di un'alterazione genetica, e forme acquisite provocate da un'inattivazione funzionale del fattore normalmente sintetizzato ad opera, ad esempio, di autoanticorpi; quest'ultimo quadro può costituire una manifestazione secondaria in corso di malattie autoimmuni.

Poiché il sistema complementare interviene in molte funzioni della risposta immunitaria, alterazioni dell'attività del sistema possono essere anche rilevati in test (opsonizzazione, chemiotassi, ecc.) che sono stati precedentemente descritti per la valutazione funzionale di altre componenti del sistema immunitario.

I test riportati in questo capitolo sono fondamentali per valutare la funzione del sistema immunitario. Tuttavia, anche se in molte situazioni di gravi ID primitive o secondarie essi consentono la diagnosi e se risultati completamente normali permettono di escludere queste patologie, in alcuni casi possono sorgere difficoltà di fronte a risultati che si collocano in una zona "grigia". Per risolvere questi casi ci si deve affidare alla combinazione di più test, alle indagini più sofisticate, ma talora può essere opportuno indirizzare il paziente a Centri altamente specializzati.

Le informazioni che sono venute dalla ricerca negli ultimi anni e che ci consentono di comprendere meglio, anche a livello molecolare, le complesse interazioni immunoregatorie che avvengono nella risposta immunitaria potranno avere importanti conseguenze cliniche in un prossimo futuro. In particolare l'inquadramento nosologico delle ID primitive e secondarie potrà subire modifiche con l'individuazione di nuove forme o la distinzione di sottotipi diversi nell'ambito di alcune di quelle già note. Anche le possibilità diagnostiche, che negli ultimi anni sono state rivoluzionate dai progressi della biologia molecolare e consentono oggi in molti casi la diagnosi prenatale di alcune malattie, potranno avere ulteriori evoluzioni positive.

IMMUNOSOPPRESSIONE FARMACOLOGICA

(L. EMMI, F. CHIARINI)

Recenti acquisizioni di ordine farmacologico, unitamente ai notevoli progressi compiuti nel campo dell'immunologia di base, hanno permesso una migliore utilizzazione di farmaci tradizionali, nonché l'acquisizione di nuove strategie terapeutiche capaci di modulare la risposta immune.

In linea teorica una terapia immunosoppressiva, oltre ad agire a livello midollare inibendo la linea linfo-mielocitica, può anche essere in grado di modulare l'espansione dei cloni T e B autoreattivi responsabili rispettivamente del reclutamento di altre popolazioni cellulari attraverso la sintesi di citochine

Piccin Nuova Libreria S.p.A.

35121 Padova (Italia) - Via Allinate, 107 - Codice Fiscale e Partita IVA n. 01524160288

Tel. 049 65 55 66 - Fax 049 875 06 93

web: www.piccin.it - e-mail: info@piccin.it

DICHIARAZIONE

Si dichiara che il Professor Fabio Almerigogna è autore dei seguenti argomenti:

**VALUTAZIONE DIAGNOSTICA DEL SISTEMA IMMUNITARIO
e
IMMUNODEFICIENZE PRIMITIVE E SECONDARIE**

che sono state pubblicate nella nuova edizione del

**Volume I
del
TRATTATO DI MEDICINA INTERNA
Fondato da
Paolo Larizza**

per i tipi della nostra Casa Editrice.

Si rilascia la presente su richiesta dell'interessato per gli usi consentiti dalle leggi vigenti.

Padova, lì 3 novembre 2010

PICCIN NUOVA LIBRERIA S.p.A.

